

PAULO ANGELO MARTINS

**RESPOSTA IMUNITÁRIA EM RATOS SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE
PEIXE E GLUTAMINA, TREINADOS DURANTE SEIS SEMANAS**

Dissertação de Mestrado defendida como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Educação Física, no Departamento de Educação Física, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

PAULO ANGELO MARTINS

**RESPOSTA IMUNITÁRIA EM RATOS SUPLEMENTADOS COM ÓLEO DE
PEIXE E GLUTAMINA, TREINADOS DURANTE SEIS SEMANAS**

Dissertação de Mestrado defendida como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Educação Física, no Departamento de Educação Física, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ CLAUDIO FERNANDES

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nortear minha vida e minhas decisões, principalmente por nunca desistir e sempre acreditar e estudar.

A minha família, meu maior valor. Pelo amor e incentivo que sempre me fez perseverar e conquistar tudo o que tenho.

Ao prof. Luiz Claudio Fernandes, que não foi apenas um orientador, mas sim, um exemplo de competência, postura e integridade. Sempre incansável, atencioso e bem humorado. Tenho a satisfação de dizer que sei a postura profissional que vou tomar em minha vida pelo bom exemplo que tive.

Aos meus amigos de laboratório: Fabiola, Everson , Gleison, Andressa, Luis, Carine , Diogo, Carina, Sandro, Sergio, Marcelo, Cristina, Jaisson, Ana, Luciana, Maurício, Norton e todos que sempre, com muita gentileza e disposição, me ajudaram de forma simples com uma conversa rápida, ou mesmo, naqueles dias de experimento em que minhas muitas preocupações tornavam-se serenas, pois sabia que podia contar com pessoas em quem podia confiar.

Ao Professor João E. Siqueira, meu treinador, incentivador e amigo que me mostrou o caminho que minha carreira profissional pode seguir.

Aos professores Raul Osieck e Luis Fernando Pereira por sua boa vontade em apreciar esse trabalho.

Aos estagiários do laboratório e funcionários do biotério e da manutenção da UFPR que nunca recusaram em atender um pedido de socorro nas horas de emergência com imprevistos.

A UFPR e todos aqueles que me ajudaram a concluir mais um grande passo em minha vida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	10
ABSTRACT.....	11
1.0 - INTRODUÇÃO	12
1.1 - GLUTAMINA.....	12
1.2 - GLUTAMINA E SISTEMA IMUNITÁRIO	15
1.3 - PRODUÇÃO DE RADICAIS LIVRES	18
1.4 - CONCENTRAÇÃO DE GLUTAMINA	20
1.5 - ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS	21
1.6 – EXERCÍCIO FÍSICO	25
1.7 - EXERCÍCIO CRÔNICO E SISTEMA IMUNITÁRIO	26
1.8 – OBJETIVO GERAL	28
1.9 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
2.0 - MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1 - ANIMAIS.....	29
2.2 - TREINAMENTO FÍSICO	30
2.3 - DETERMINAÇÃO DA LACTATEMIA PÓS-TREINAMENTO	31
2.4 - SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE PEIXE E COM GLUTAMINA	31
2.5 - MENSURAÇÃO DA MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS	32
2.6 - OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS.....	32
2.7- OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS.....	32
2.8 - DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO	33
2.9 - MENSURAÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO	33
2.10 - DETERMINAÇÃO DE VOLUME LISSOSSOMAL	34
2.12 - OBTENÇÃO E CONTAGEM DOS LINFÓCITOS	35
2.14 - DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE GLICOGÊNIO HEPÁTICO.....	35
2.15 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
3.0 - RESULTADOS	37
3.1 - MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS	37
3.3 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	39
3.3.1 - CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE GLICOSE.....	39
3.4 - PARÂMETROS DE IMUNIDADE INATA.....	40
3.4.1 – FAGOCITOSE PELOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS	40
3.4.1 – VOLUME LISSOSSOMAL DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS	41
3.4.3 – PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO PELOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS	42
3.4.4 - PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO PELOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	43
3.4.5 – FAGOCITOSE PELOS NEUTRÓFILOS DO SANGUE	45
3.4.6 - VOLUME LISSOSSOMAL PELOS NEUTRÓFILOS DO SANGUE	46
3.4.7 – PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO PELOS NEUTRÓFILOS DO SANGUE.....	47
3.4.8 - PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO PELOS NEUTRÓFILOS DO SANGUE	49
3.5 - PARÂMETROS DE IMUNIDADE ADAPTATIVA	51
3.5 - PARÂMETROS DE IMUNIDADE ADAPTATIVA	51
3.5.1 - PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS OBTIDOS DO BAÇO	51

3.5.2 - PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS OBTIDOS DO TIMO	52
3.5.3 - PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS OBTIDOS DO LINFONODO MESENTÉRICO	53
4.0 - DISCUSSÃO	54
5.0 - CONCLUSÕES	60
6.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
ANEXOS	69
COMPOSIÇÃO RAÇÃO ANIMAL UTILIZADA NO EXPERIMENTO.....	69
PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE RATOS	71
DEFINIÇÕES CONCEITUAIS	73
DEFINIÇÕES OPERACIONAIS	73

ABREVIATURAS

AACR – Aminoácido de cadeia ramificada

Acetil-CoA – Acetil-coenzima A

AG – Ácidos graxos

AGPI – Ácidos graxos poliinsaturados

APC - Células Apresentadoras de Antígenos

B – Célula linfocitária auxiliar tipo B

CD4 – Cluster diferencial 4

CD8 – Cluster diferencial 8

cels/mL – Células por mililitros

CK – Creatina kinase

ConA – Concavalina-A

DHA - Ácido docosaheptaenóico

DMSO - Dimetil sulfóxido

DNA – Ácido desoxiribunucleico

EPA – Ácido eicosapentaenóico

EROS – Espécies reativas de oxigênio

IFN- γ – Interferon gama

IgA – Imunoglobina tipo A

IgE – Imunoglobina tipo E

Igs - Imunoglobulinas

IL-1 – Interleucina 1

IL-1ra – Interleucina 1 em receptor antagonista

IL-6 – Interleucina 6

IRTS – Infecções do trato respiratório superior

LB – Linfócitos do tipo B

LT – Linfócitos do tipo T

LPS - Lipopolissacarídeos

MHC-I – Histocompatibilidade de classe 1

MHC-II – Histocompatibilidade de classe 2

MiliQ – Água bi-destilada

MIP- α - Proteína inibitória do macrófago tipo alfa
MIP-1 β - Proteína inibitória do macrófago tipo 1 β
ml - mililitros
mM – milimol ou milimoles
n – Número populacional
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NBT - “Nitroblue tetrazolium”
NK – Células natural killer (células assassinas)
N^m – Transportador de insulina
NO – Óxido nítrico
N-3 – Ácido graxo poliinsaturado omega 3
O₂⁻ - Ânion superóxido
PBS – Solução tampão fosfato-salina
PRC – Proteína C reativa
R - Rotações
T – Célula linfocitária auxiliar tipo T
Tc – Célula auxiliar tipo T citotóxica
TCA – Ácido tri-carboxílico
TGA – Ácido graxo tricarboxílico
Th – Célula auxiliar T helper
TLC – Cromatografia de camada delgada
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
U/ml – Unidades por mililitros
VO₂ max. – Volume máximo de oxigênio
 ΔG – Variação de energia
 μg - Micrograma
 μL - Microlitros

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolo de exercícios aplicados no estudo.

Tabela 2 - Resultados de massas corporais médias iniciais e finais dos animais por grupo e ganho de peso médio diário por grupo.

Tabela 3 - Resultados de lactato sérico obtidos imediatamente após exercício durante as seis semanas.

Tabela 4 – Proliferação de linfócitos de baço com e sem estimulação (con-a).

Tabela 5 – Proliferação de linfócitos de timo com e sem estimulação (con-a).

Tabela 6 – Proliferação de linfócitos de linfonodo mesentérico com e sem estimulação (con-a).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da glutamina.

Figura 2 - Metabolismo da glutamina e do glutamato em células de mamíferos.

Figura 3 - Glutamina e relação tecidual.

Figura 4 - Fagocitose realizada por macrófagos.

Figura 5 - Integração entre células apresentadoras de antígenos.

Figura 6 - Estrutura molecular dos ácidos graxos poliinsaturados.

Figura 7 - Percentagem de gordura ingerida por nossos ancestrais desde a época paleolítica até a atualidade.

Figura 8 - Concentração de glicose plasmática sérica.

Figura 9 - Volume lisossomal de macrófagos.

Figura 10 - Fagocitose de macrófagos.

Figura 11 – Produção de ânion superóxido de macrófagos.

Figura 12 – Produção de peróxido de hidrogênio de macrófagos.

Figura 13 - Fagocitose de neutrófilos.

Figura 14 – Volume lisossomal de neutrófilos.

Figura 15 – Produção de ânion superóxido de neutrófilos.

Figura 16 – Produção de peróxido de hidrogênio de neutrófilos.

RESUMO

O treinamento desportivo moderno tem utilizado formas de controle de sobrecargas e suas variáveis, tendo como principais avaliações o lactato plasmático e o consumo máximo de oxigênio. Entretanto, atletas têm apresentado diferentes infecções e inflamações em períodos competitivos, em particular às do trato respiratório superior, marcantes em atletas corredores de fundo que se utilizam de sobrecargas de alta intensidade e longa duração. Sendo assim, faz-se necessário o acompanhamento no continuum do treinamento das variações do sistema imunitário. Muitas suplementações são utilizadas no intuito de se minimizar esses efeitos patogênicos, porém em sua maioria com efeitos sobre a performance e não sobre o sistema imunitário. Sabe-se que o óleo de peixe, rico em ácidos graxos poliinsaturados ômega-3, possui propriedades de modulação do sistema imunitário, agregam-se a membrana plasmática, tornando-a mais permeável e fluídica alterando assim a função celular. Outra suplementação postulada é a de glutamina, aminoácido esse que é utilizado junto com a glicose como fonte de energia para as células do sistema imunitário. Em adição é fundamental para as células de proliferação rápida. Tem sido demonstrado que a administração de 1g/kg de óleo de peixe e 0,125g/Kg de glutamina apresentam resultados relevantes sobre o sistema imunitário. Ratos Wistar, foram divididos em 8 grupos: Sedentário (C), Sedentário e suplementado do óleo de peixe (N3), Sedentário e suplementado com glutamina (GL), Sedentário e suplementado com óleo de peixe e glutamina, Exercitado (EX), Exercitado e suplementado com óleo de peixe (EXN3), Exercitado e suplementado com glutamina (EXGL), Exercitado e suplementado com ambas as suplementações (EXN3GL). Os animais foram submetidos a treinamento de natação quatro vezes por semana com 6% de sobrecarga em sessões de 90 minutos (3 X 30 minutos). Os efeitos sobre o sistema imunitário demonstraram que os animais exercitados elevaram a resposta imunitária inata e adaptativa. A suplementação com óleo de peixe promoveu elevou a produção de H_2O_2 e O_2^- . A Glutamina não teve efeito significativo. A associação de ambas suplementações ao exercício teve efeito aditivo principalmente sobre o sistema adaptativo, especificamente sobre a proliferação de linfócitos do timo.

ABSTRACT

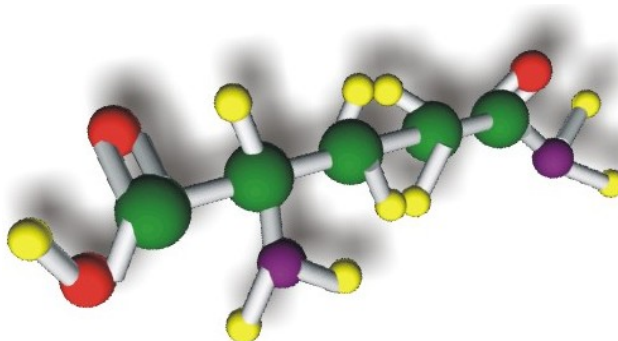
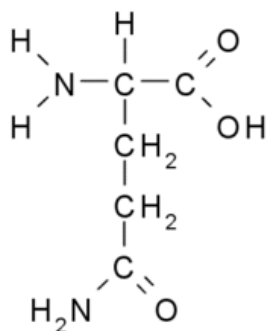
The modern sport training lactate measurement has been used as parallel method to determine oxygen consumption. Athletes under high aerobic effort and intensity are more prone to infections and inflammations of the upper respiratory system. Therefore it is necessary to follow up of the continuum of the training on immune system response. Fish oil, rich in polyunsaturated fatty acids n-3 (PUFA n-3) is a supplement that has been used as an immunomodulatory. In fact its consumption leads to incorporation of PUFA n-3 in the plasma membrane causing structural changes and thus cellular function. Another important supplement is glutamine. This amino acid is quite important to very rapid proliferation cells such as enterocytes, cancer and lymphocytes as well as macrophages. Wistar rats set up in 8 groups were divided as follows: Sedentary (C), Sedentary and supplemented with fish oil (N3), Sedentary and supplemented with glutamine (GL), Sedentary and supplemented with fish oil and glutamine, Exercised (EX), Exercised and supplemented with fish oil (EXN3), Exercised and supplemented with glutamine (EXGL), Exercised and supplemented with both supplementations (EXN3GL). The animals were submitted to swimming training a week four times with 6 % of overload in sessions of 90 minutes (3 X 30 minutes). Exercised animals presented elevated response on innate and adaptive immune system. The supplementation with fish oil increased the production of H_2O_2 and O_2^- . Glutamine didn't have any significant effect. Association of both supplementations to the exercise caused great effect mainly in the adaptive system, particularly on lymphocyte proliferation from thymus.

1.0 - INTRODUÇÃO

1.1 - GLUTAMINA

Glutamina é o aminoácido livre mais abundante que possuímos (Figura 1), com aproximadamente 20 a 25 % no plasma e 60 % ou, 0,5 a 0,9 mM e, em sua forma livre, na musculatura esquelética (GRIFFITHS, 2001; CURI, 1986; CASTELL, 2002, ROGERO, 2003). Ela é crítica na integridade e atividade funcional metabólica nos tecidos (GRIFFITHS, 2001).

Glutamina teve sua importância molecular reconhecida em 1873, por sua influência indireta na estrutura de proteínas (HLASIWETZ; HABERMANN, 1873). Em 1883, foi encontrada em abundância em certas plantas (SCHULZE; BOSSHARD, 1883). Nos anos 30, estudos sobre o metabolismo da glutamina revelaram que tecidos de mamíferos tinham a capacidade de hidrolisá-la e sintetizá-la (KREBS, 1935). Rose (1938) classificou-a como aminoácido não essencial, baseando-se nos estudos em que a glutamina não era requerida como nutriente da dieta. Na década de 50, Eagle e colaboradores (1955), reportaram que a glutamina era importante para células *in vitro*, e posteriormente foi mostrado que sua concentração na circulação era superior ao dobro do que qualquer outro aminoácido (MEISTER, 1980).



Figuras 1. Estrutura química da glutamina (carbono = verde, hidrogênio = amarelo, nitrogênio = roxo, oxigênio = vermelho)

A literatura menciona que as funções da glutamina são muitas, por exemplo: ela é substrato para síntese de proteínas, precursora de anabólicos para crescimento do músculo, reguladora do equilíbrio de ácido-base no rim, é substrato para urogênese no fígado e gliconeogênese hepática e renal, ela age como um combustível oxidativo no intestino e nas células do sistema imune e provém o transporte de nitrogênio entre órgãos, e age como precursora da síntese de neurotransmissores, de nucleotídeos, da síntese de ácidos nucléicos e da produção de glutatona. (Figura 2). Ainda, é necessária para o crescimento e diferenciação celular, veículo de transporte de cadeia carbônica entre órgãos e fornecedora de energia para células de rápida proliferação, tais como enterócitos e células do sistema imunitário (SPITTLER, 1995), de mediadores como o ácido gama aminobutírico (GABA) e glutamato, promove melhora na permeabilidade e integridade intestinal, aumenta a resistência às infecções por aumentar a função fagocitária, e fornece energia aos fibroblastos, aumentando a síntese de colágeno (ROGERO, 2003; KREIDER, 1999).

Em situações de estresse, tanto no trauma clínico quanto na inanição ou exercício intenso e prolongado, a concentração de glutamina no sangue diminui, ocasionando freqüentemente imunodepressão. (CASTELL, 2003; ROGERO, 2003; NEWSHOLME, 2003).

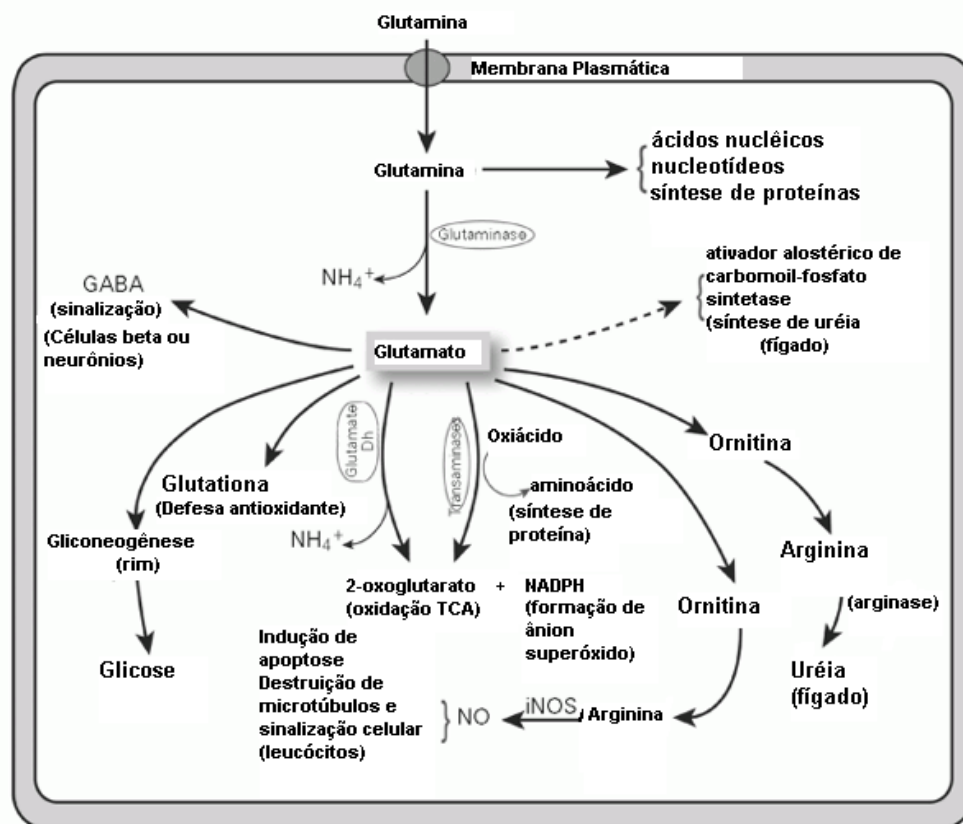


Figura 2 - Metabolismo da glutamina e do glutamato em células de mamíferos. Adaptado de NEWSHOLME e colaboradores (2003).

Uma das principais características da glutamina é ser sintetizada por todos os tecidos do organismo. Sendo assim, torna-se essencial em patologias que envolvam catabolismo intenso, ou mesmo no exercício intenso, pela maior demanda metabólica. Por esta razão, a glutamina foi classificada como “condicionalmente essencial” (LACEY; WILMORE, 1990; ROGERO, 2003).

O tecido muscular é o principal tecido sintetizador de glutamina, e por isso detém a maior concentração do que outros tecidos (Figura 3). Portanto, a concentração plasmática de glutamina pode ser considerada a ligação metabólica entre o músculo e outras células, em particular, as do sistema imunitário (CASTELL; NEWSHOLME, 1997a). Confirmando essa afirmação, GRIFFITHS (2001) observou estreita relação entre a concentração plasmática de glutamina e linfócitos *in vivo* e *in vitro*.

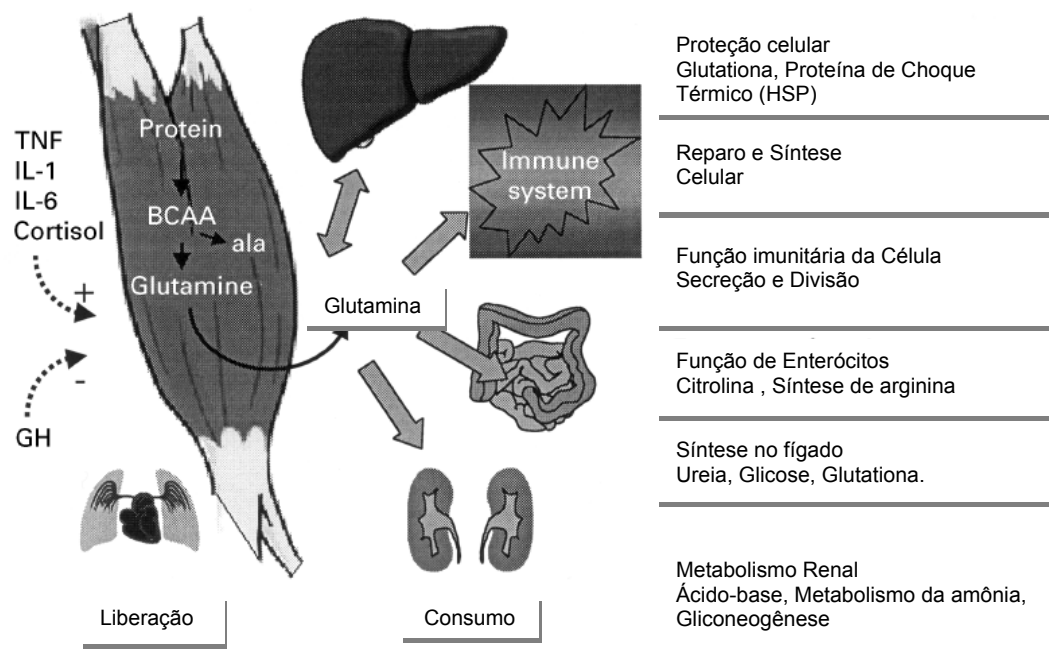


Figura 3 – Glutamina e sua relação tecidual. TNF, fator de necrose de tumor, interleucina (IL), hormônio do crescimento (GH), aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA) e alanina (ala) (GRIFFITHS, 2001).

1.2 - Glutamina e sistema imunitário

Glutamina é fonte de energia para células do sistema imunitário, provê precursores para a gliconeogênese, síntese de proteínas importantes no fígado (proteínas de fase aguda) e síntese de peptídeos importantes como a glutathione. Eventos estes todos relacionados ao bom desenvolvimento da imunidade (NEWSHOLME, 1997a, 2003).

É postulado que a utilização da suplementação de glutamina tem resultados imunomoduladores (JOYNER, 2005). A ação da glutamina se evidencia primeiramente nas células de imunidade inata que compõem as barreiras físicas, células fagocitárias no sangue e tecidos, linfócitos denominados matadores naturais (*natural killers* - NK), e diversas moléculas originárias do sangue (ABBAS *et al.*, 1997, p.4). Já na resposta imunitária adaptativa ou adquirida, que é mais eficaz, observa-se a atuação de células de memória que reconhecem o próprio do não próprio (ROITT, 1998, p.1).

Vários estudos apontam que o exercício exaustivo e prolongado está associado com efeitos adversos da função imunitária, como por exemplo, a diminuição da atividade citotóxica das células NK, menor número de linfócitos-T por 3-4 horas pós-exercício, diminuição na habilidade proliferativa de linfócitos e diminuição na proporção de células T-helper ($CD4^+$) e T-supressor ($CD8^+$) (CASTELL *et al.*, 1997b).

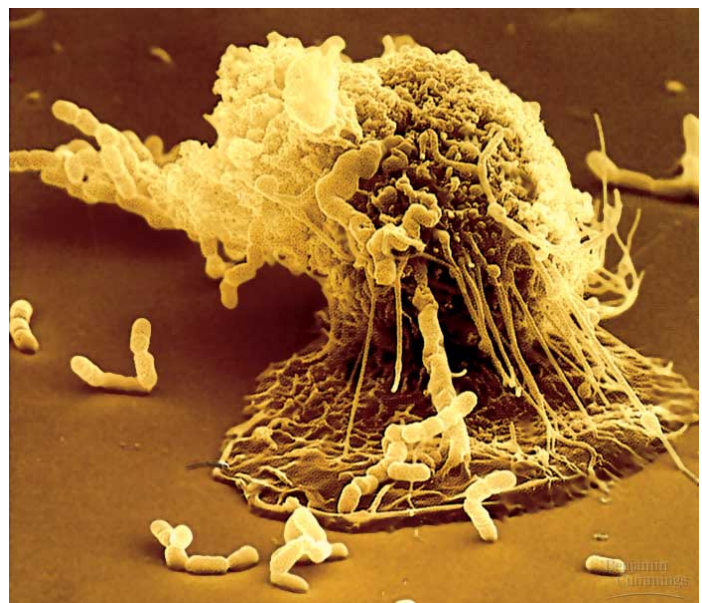
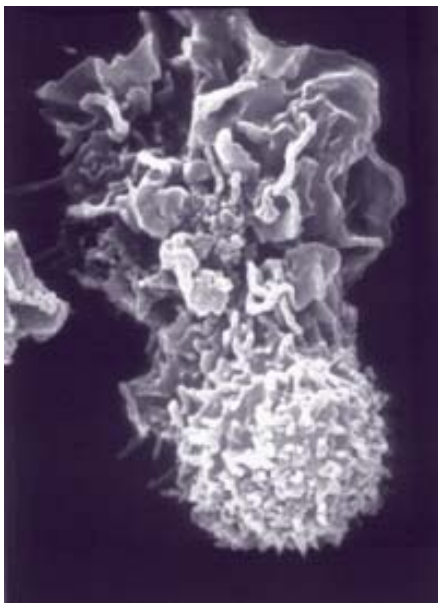
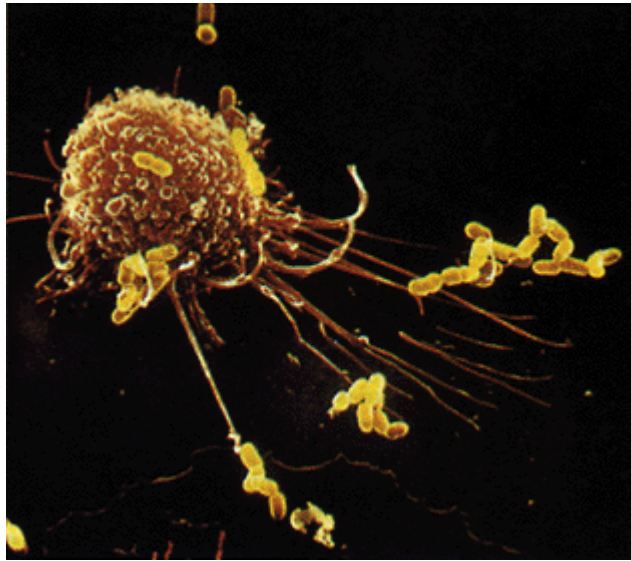


Figura 4 – Macrófagos em processo de fagocitose

Para a fagocitose ocorrer (figura 4) há migração da célula em direção ao agente invasor, o reconhecimento, via receptores de membrana, da partícula ou microorganismos a serem ingeridos. Posteriormente, há internalização e formação da vesícula fagocítica. O processamento deste material pelo macrófago ocorre através da formação de fagolisossomos. A vesícula fagocítica se unirá a um lisossomo carregado de enzimas onde a extrusão dos restos ocorrerá por exocitose (ADAMS; HAMILTON, 1984).

1.3 - Produção de radicais livres

Muitas vezes os radicais livres de oxigênio produzidos naturalmente pelo nosso organismo são de grande importância, como na ativação do sistema imunológico, no processo de desintoxicação de drogas e na produção do fator relaxante derivado do endotélio (óxido nítrico), que é fundamental para o relaxamento dos vasos sanguíneos. Cerca de 2 a 5% do oxigênio total consumido dão origem a produtos reduzidos como o radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxilas (COOPER, 2002).

Esses subprodutos de oxigênio são coletivamente chamados de espécies reativas de oxigênio. Esses radicais livres são responsáveis por ações deletérias como, a oxidação de estruturas celulares com prejuízo na homeostase intracelular. A adequação orgânica promovida pelo aumento da ação tóxica dos radicais livres, ocorre pela ação do sistema enzimático antioxidante, no qual as enzimas parecem possuir a capacidade de se adequar ao aumento da produção da EROs através do aumento na sua atividade. Ainda assim, temos a ação de várias moléculas e sais minerais com ação antioxidante que também são consumidas na dieta, como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (precursor de vitamina A), selênio, zinco, cobre, glutathione reduzida (GSR) e ácido ascórbico. Embora essas defesas antioxidantes reduzam o risco de lesões oxidativas da EROs, hábitos de vida inapropriados, tais como, o consumo excessivo de álcool, hábito de fumar, dieta inadequada, exposição freqüente à radiação não ionizante UV, à poluição, além do estresse emocional, do envelhecimento e da prática constante de exercício extenuante, podem desencadear um desequilíbrio entre a defesa antioxidante e a produção da EROs, gerando estresse oxidativo. O exercício físico está associado ao aumento de radicais livres devido ao aumento do consumo de oxigênio pelos tecidos ativos. Após o exercício físico agudo ou crônico existe aumento da concentração de radicais livres nos tecidos biológicos que coincide com a presença de danos teciduais (COOPER, 2002).

A geração de ânion superóxido (O_2^-), pela NADPH oxidase, é o ponto de início para a produção de outros agentes oxidantes, incluindo halogênios oxidativos, radicais livres e oxigênio *singlet*. Estes metabólitos incluem o íon superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila (BARBIOR, 1984; WHITACRE, 1992), que ao serem sintetizados promovem a elevação do consumo de oxigênio, da onde vem a

denominação “burst” oxidativo (BARBIOR, 1984; BROZNA *et al.*, 1988, PITHON-CURI *et al.*, 2002).

Estes oxidantes são usados por macrófagos e neutrófilos para matar microorganismos invasores (BARBIOR, 1984), mas eles também causam muitos danos em tecidos próximos. Assim, suas produções devem ser bem reguladas para assegurar que eles sejam gerados somente quando e onde requeridos (PITHON-CURI *et al.*, 2002). A produção e liberação de metabólitos reativos do oxigênio, promovida pela endocitose, faz parte dos mecanismos microbicidas utilizados pelo macrófago.

A realização destas funções pelo macrófago permite sua participação em processos mais elaborados. Dentre estes destaca-se o papel de apresentador de antígenos para células do sistema imunitário (linfócitos T e células B). Para a efetivação desta tarefa, o macrófago internaliza a partícula ou microorganismo, associados à moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC-II) e classe I (MHC-I), permitindo assim seu reconhecimento pelos linfócitos T ($CD4^+$) e ($CD8^+$), respectivamente (Figura 5). Este processo inclui transcrição gênica e conseqüente aumento da expressão das moléculas (MHC I e II) na membrana celular do macrófago (CRESSWELL, 1985) e não apenas a apresentação do antígeno ao linfócito T, mas também sua ativação, através da interação com outros receptores (QIN *et al.*, 1989; MIYAZAKI *et al.*, 1993).

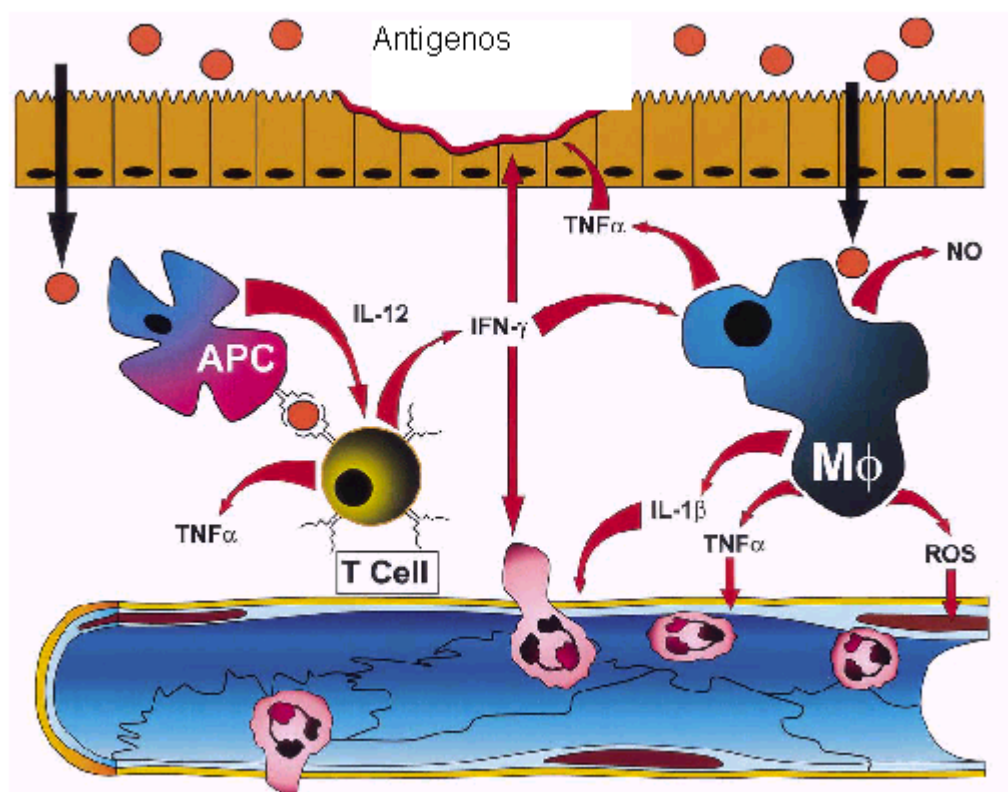


Figura 5 - Interação entre células apresentadoras de antígeno (APC), Linfócitos T (T Cell) e macrófagos (MØ). Adaptado de PAVLOVICK e colaboradores (2002).

1.4 - Concentração de glutamina

Muitos estudos epidemiológicos têm mostrado que a incidência de infecções no trato respiratório superior (IRTS) aumenta durante a 1ª e 2ª semanas, após uma série de exercícios prolongados e extenuantes (NIEMAN *et al.*, 1990; PETERS *et al.*, 1993). Um estudo em Los Angeles, mostrou que atletas de maratona tornaram-se doentes depois da corrida, numa proporção seis vezes maior do que atletas não participantes, os quais tinham nível similar de treinamento (CASTELL *et al.*, 1996). Isto sugere que exercício regular e moderado melhora o sistema imunitário diminuindo a suscetibilidade a infecção em indivíduos sedentários, mas que indivíduos que praticam treinamento excessivo ou intenso têm maior risco à infecções (CASTELL *et al.*, 1996; CASTELL, 2002).

Vários estudos demonstraram que o exercício físico pode alterar a concentração de glutamina disponível para as células de defesa. Por isso sua suplementação tem sido recomendada para atletas que são submetidos a programas

de exercício intenso e de longa duração. BASSIT e colaboradores (2000) observaram magnitude similar de diminuição de 40% na incidência de infecção em triatletas depois de suplementação diária com aminoácidos de cadeia ramificada (AACR). Como estes são precursores de glutamina, os AACR mantiveram as concentrações da glutamina plasmática e os autores atribuíram isto a diminuição na incidência de doenças.

Outros estudos demonstraram que, durante e após o exercício exaustivo, ocorre aumento da captação de glutamina por diversos órgãos, o que supera as taxas de síntese e liberação de glutamina pelo músculo esquelético, acarretando na diminuição do fornecimento deste aminoácido para as células do sistema imunitário (ROHDE *et al.*, 1998; GIBALA, 2001). Ainda, a razão plasmática de glutamina/ácido glutâmico tem sido usada como marcador biológico de *overtraining* onde a razão 3,58/5,88 respectivamente, indica que o atleta pode continuar a treinar e razão menor que 3,58 aponta para o estado de *overtraining* (SMITH, 2000).

1.5 - ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS

Os ácidos graxos (AG) são considerados a base para a síntese de lipídeos, em que as propriedades de solubilidade e flexibilidade, determinam o tamanho da cadeia e o grau de instauração (FETT 2001). AG poliinsaturados de cadeia longa (AGPCL) são mais flexíveis e solúveis do que os saturados (NETTLETON, 1995). Duas famílias importantes de AGPCL desempenham papel fundamental na biologia de mamíferos. São os AGPCL n-6 (ômega-6 ou ω -6), derivada do AG linoléico e da família n-3 (ômega-3 ou ω -3), derivada do AG linolênico (figura 6).

Esses AGPCL possuem duas ou mais duplas ligações. A denominação ômega é porque a primeira dupla é localizada a partir deste carbono, que para simplificar é o radical metila (GRUNDY, 1996). O ácido graxo α -linolênico, com 18 carbonos e três duplas ligações (18:3), é o principal representante ω -3, e pode ser encontrado principalmente nos fitoplânctons, em peixes marinhos de locais bem frios que se alimentam deles, e em óleo vegetais de linhaça e canola. Os fitoplânctons sintetizam os ácidos eicosapentaenóicos (EPA) e docosahexaenóico (DHA) existentes em grandes concentrações nos óleos de peixes de águas frias e profundas, como a sardinha, cavala, salmão, truta e atum (DEVLIN, 1997).

Os eicosanóides são grupos de compostos biologicamente ativos de vinte carbonos (C20) que incluem as prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos. Todos eicosanóides são derivados do ácido araquidônico. São sintetizados à partir dos ácidos graxos poliinsaturados componentes dos fosfolípides das membranas celulares. São considerados hormônios parácrinos, pois agem nas células próximas donde são sintetizados. Estão envolvidas na função reprodutiva, na inflamação, febre, dor associada à lesão ou doença, formação das plaquetas e regulação da pressão arterial, secreção de ácidos gástricos e uma variedade de outros processos importantes na saúde ou doença humana (LEHNINGER, 2000).

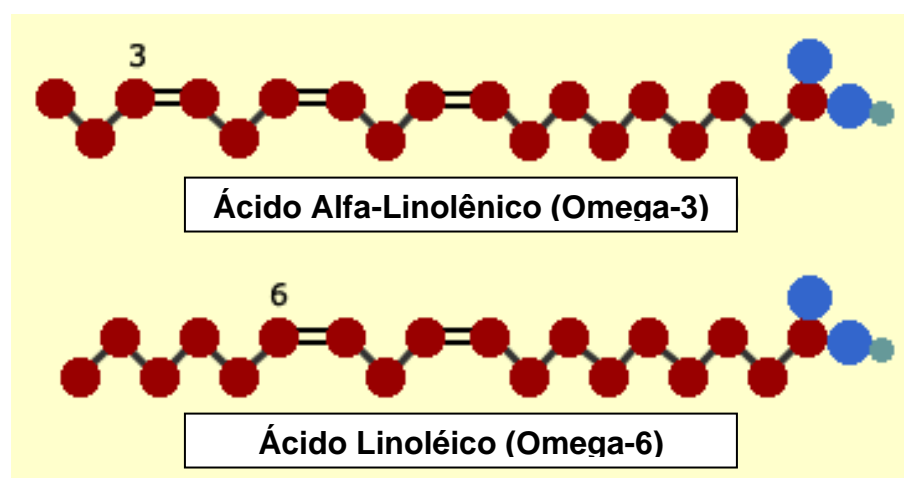


Figura 6: Estrutura molecular dos ácidos graxos poliinsaturados Omega-3 e 6.

O AG omega-3 quando incorporado na membrana da célula influencia na fluidez da membrana, na função de receptor, na atividade enzimática, no tipo de citocinas e na produção de eicosanóides (LEHNINGER, 2000). A suplementação oral com AG omega-3, rico no óleo de peixe, em sujeitos saudáveis decresceu a produção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 nos monócitos isolados e o fator de necrose tumoral, bem como de interleucina-2 (WU, MEYDANI, HAYEK, HUTH, *et al.*, 1996).

Efeitos biológicos dos AG α -3 são caracterizados pela diminuição na aderência de plaquetas, diminuição nas concentrações de triacilgliceróis, colesterol e

mudanças no endotélio vascular resultantes na produção de compostos antiinflamatórios, dentre outros (FETT, 2001).

O AG ômega-3 promove, também, a formação da prostaglandina da série E1, estimuladora da liberação de somatotropina (KARLSSON, 1997). Os indicativos recentes relacionam-se mais ao desempenho de atividades aeróbias devido às propriedades vasodilatadoras do AG n-3, melhorando o fluxo de O₂ e nutrientes para os tecidos musculares durante o exercício (BUCCI, 1993).

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) linoléico (n-6) e o α -linolênico (n-3) são considerados ácidos graxos essenciais (AGE) porque não podem ser sintetizados pelo organismo (GRUNDY, 1996). A essencialidade dos AGPI n-6 é conhecida desde a década de 1930. Sua deficiência, está associada a problemas dérmicos. Quanto ao AGPI n-3, só após a década de 1980 é que foi revelada sua necessidade na dieta para evitar, principalmente, distúrbios neurológicos e visuais (CURI *et al.*, 2002). Vários estudos demonstraram que a ingestão de peixes, principal fonte de AGPI n-3, reduz o risco para doenças cardiovasculares (HE *et al.*, 2002; WILLETT & SPAMPFER, 2003).

Nos últimos 200 anos houve grande alteração no padrão de ingestão de gordura do homem ocidental (figura 6). Atualmente, a população ocidental ingere quantidade muito grande de AGPI n-6 em relação à de n-3 (20-40:1). Isto tem sido associado ao desenvolvimento de várias patologias, tais como doenças cardiovasculares, câncer, doenças autoimune e inflamatórias (ABEYWARDENA, 2001; SIMOPOULOS, 2002; 2006). Ingestão adequada de AGPI n-3 pode diminuir os riscos de desenvolvimento destas patologias (ASHERIO *et al.*, 1996; ALEXANDER, 1998; PABLO *et al.*, 2000; CALDER *et al.*, 2002; CURI *et al.*, 2002; TOGNI *et al.*, 2003).

SIMOPOULOS (2002) advoga que se a ingestão de AGPI n-6 e n-3 for nas proporções de 4:1 teríamos redução de 70% da mortalidade por doenças cardiovasculares; de 2,5:1 teríamos redução da proliferação celular em pacientes com câncer de colo retal; de 2-3:1 teríamos diminuição da inflamação em pacientes com artrite reumatóide e de 5:1 teríamos benefícios em pacientes com asma.

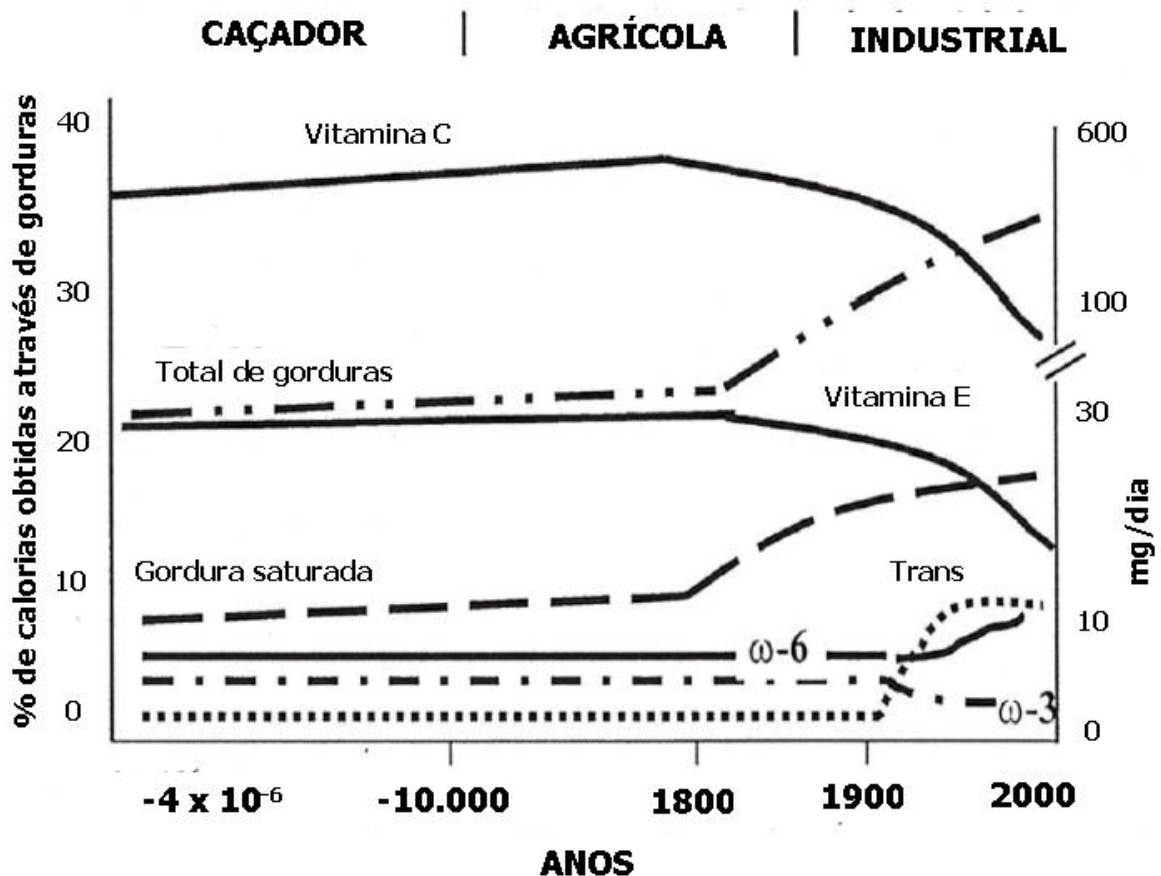


Figura 7: Percentagem de gordura ingerida por nossos ancestrais desde a época paleolítica até a atualidade (SIMOPOULOS, 2002).

A resposta imunitária específica é modificada pelos ácidos graxos que agem como mediadores intracelulares e intercelulares. Os AGPI da família ômega-3 em determinada concentração têm efeito supressor, inibindo a proliferação de linfócitos, a produção de anticorpos e citocinas, a expressão de moléculas de adesão, a atividade de células citotóxicas e causam a morte celular (CURI *et al.*, 2002). Tem sido relatado que a suplementação com óleo de peixe, rico em AGPI n-3, reduz a produção das citocinas interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), do fator de necrose tumoral (TNF) pelas células mononucleares em voluntários normais, sendo que este efeito é mantido por várias semanas após a interrupção da suplementação (ENDRES *et al.*, 1989; COOPER *et al.*, 2002). Dietas ricas em AGPI n-3 diminuem a produção de interleucina 2 (IL-2) pelos linfócitos de roedores e humanos. A IL-2 e interferon gama (IFN-γ) estão envolvidos na imunidade célula-mediada, na ativação de macrófagos e células NK

(*natural killer*) e na rejeição de transplantes e reações inflamatórias (MEYDANI *et al.*, 1993; CALDER 1997 e 1998a).

O papel modulador dos AGPI n-3 sobre o sistema imunitário tem sido comprovado através de estudos epidemiológicos, clínicos e em modelos animais (CALDER 1997, 1998a, b) e através da observação das populações de esquimós, que consomem grande quantidade de foca e peixe, e possuem baixa incidência de doenças autoimunitárias, cardíacas, câncer e distúrbios neurológicos (SIMOUPoulos 2002, KROMANN 1980; BITTNER *et al.*, 1988). Vários estudos têm demonstrado significativa redução de inflamações em pacientes com artrite reumatóide (KREMER *et al.* 1990), psoríase (BITTNER *et al.*, 1988), lupus eritematoso (WATSON *et al.* 1991) e de esclerose múltipla (DAS 1994; HARBIGE 1998). Em geral, essas doenças auto-imunes são caracterizadas pela atividade exacerbada do sistema imunitário, com ativação inapropriada dos linfócitos T, resultando na destruição de tecidos do hospedeiro. Tipicamente, os sítios de destruição (por exemplo, articulações na artrite reumatóide, tecido neural na esclerose múltipla) contêm linfócitos T ativados e mediadores químicos produzidos por essas células, que podem estimular macrófagos. A proliferação dos linfócitos e ativação de macrófagos é parte importante na resposta auto-imunizadora e a regulação desse processo representa papel central na modulação do sistema imunitário (NETTLETON, 1995).

1.6 – EXERCÍCIO FÍSICO

Exercício físico está associado com alteração na quantidade de leucócitos. Após 2,5 às 3h de corrida intensa, há aumento na quantidade de leucócitos, atingindo o pico aproximadamente 3h após a corrida e retornando ao normal no dia seguinte. A quantidade de granulócitos aumenta fortemente (neutrofilia) (~250%) acompanhada de monócitos (60%), enquanto linfócitos emergem do compartimento sanguíneo (40%). Há decréscimo nos linfócitos (linfocitopenia) por pelo menos 6 h, representados por células T e NK, mas não de células B. É interessante que duas células do sistema imunitário inato têm modificação na sua quantidade quando se executa exercício intenso (SIMPSON, 2007, PEDERSEN, 2001, 2000).

Em 1987 foi investigado em 2.311 maratonistas quantos apresentariam infecções do trato respiratório superior (NIEMAN *et al.*, 1990). Na semana seguinte a maratona, 12,9% apresentou infecção quando comparados à apenas 2,2% de atletas não competitivos. Corredores que treinam >96 km/semana dobraram os casos de doenças comparados aos que treinaram <32 km/semana. Isto sugeriu que exercício regular e moderado diminui a suscetibilidade à infecção em indivíduos que treinam com carga menor, mas em indivíduos que treinam exaustiva ou intensamente, existe maior risco à infecções (CASTELL, 2002).

Suplementação com diferentes agentes tem sido atualmente utilizada para diferentes fins, entre eles a prevenção de imunodepressão. Para tanto, alguns atletas têm sido orientados a consumir imunomoduladores, entre os mais comuns recomendados está a glutamina e aminoácidos de maneira geral. Há poucos estudos do efeito do consumo de óleo de peixe ou de n-3 nestes indivíduos.

1.7 - EXERCÍCIO CRÔNICO E SISTEMA IMUNITÁRIO.

A relação entre exercício intenso, imunidade e infecção, foram estudadas pela primeira vez em 1901 por LARRABE, quando atletas apresentaram aumento na quantidade de neutrófilos circulantes. Essa mudança nas células sanguíneas foi relacionada a doenças inflamatórias. Anos mais tarde BAAETJER (1932) demonstrou que exercício e infecção estão associados à fadiga muscular, baixa resistência e doenças infecciosas, principalmente no trato respiratório superior, em atletas.

Alguns estudos têm apontado sobre os efeitos do exercício intenso crônico sobre a função imunitária em repouso. Outros sobre as transformações na defesa imunitária, combinando a racionalidade entre o imunológico e o fisiológico (NIEMAN, 2003).

Exercício de longa duração e alta intensidade tem sido implicado no desenvolvimento de imunodepressão, contudo a maior parte dos estudos tem mostrado este efeito agudamente onde logo após a última sessão de treinamento os animais são ortotansados e as células processadas. Este dado pode ser verdadeiro para esta abordagem, contudo não nos permite concluir que o efeito de prática deste tipo de

exercício, leve de fato, a imunodepressão, uma vez que muitas variáveis como, por exemplo, as concentrações plasmáticas de cortisol estão elevadas e isto poderia ser a razão de tal achado. Ainda, a suplementação com glutamina ou óleo de peixe também têm sido usadas como imunomoduladores, entretanto não encontramos nenhum relato da utilização da associação de ambas sobre o sistema imunitário de ratos exercitados. Portanto, investigamos aqui o efeito do treinamento de 6 semanas, em ratos, submetidos a exercício com 70% do VO₂ Máx. (GOBATTO, 2001), sobre a funcionalidade do sistema imunitário para confirmar ou não esta nossa hipótese de “contaminação por variáveis” quando da investigação aguda. Assim nossa hipótese foi de que a melhor abordagem para isolar estas variáveis deveria se estender para um prazo superior a 24 horas a investigação sobre a funcionalidade do sistema imunitário. A nosso ver, isto permitiria, de fato, afirmar qual o efeito do treinamento ou condicionamento físico sobre a resposta imunitária.

1.8 – OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi de investigar o efeito da associação da suplementação com óleo de peixe e glutamina em ratos exercitados a 70% do VO_2 Máx., sobre parâmetros imunitários de células fagocíticas e proliferação de linfócitos e também sobre parâmetros bioquímicos sangüíneos, em ratos, pós 48 h de exercício.

1.9 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar estes objetivos nós analisamos:

- Glicemia e lactatemia dos animais;
- Fagocitose de macrófagos peritoneais e de neutrófilos sangüíneos;
- Volume lisossomal de macrófagos peritoneais e de neutrófilos sangüíneos;
- Produção de ânion superóxido pelos macrófagos peritoneais e de neutrófilos sangüíneos
- Produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais e de neutrófilos sangüíneos;
- Proliferação de linfócitos T obtidos do baço, timo e linfonodo.

2.0 - MATERIAL E MÉTODOS

Os reagentes usados na preparação das soluções foram obtidos da Reagen (Quimibrás Industria Química Ltda, RJ). Solução de tampão fosfato salina pH 7,4 a 10 mM (PBS) foi utilizada como meio de diluição para os corantes. O fixador utilizado será o Baker formol-cálcio (formaldeído 4%, cloreto de sódio 2% e acetato de cálcio 1%). A solução de extração consiste de ácido acético glacial 1% e etanol 50% em água destilada. A solução estoque do corante vermelho neutro (Sigma) foi preparada pela dissolução de 20 mg de corante em 1 ml de DMSO (dimetil sulfóxido – Sigma) e a solução para uso de rotina foi preparada pela diluição de 20 ml da solução estoque em 5 ml de PBS. A solução de vermelho fenol (Sigma) para os ensaios de produção de H_2O_2 consiste de 5,5 mM de dextrose, 0,56 mM de vermelho fenol e 8,5 U/ml peroxidase “horseradish” (Sigma) em PBS pH 7,4 a 340 mOsm, e foi previamente adicionado 0,05% de zimosan ($2,3 \times 10^8$ partículas/ml - Sigma), para os ensaios de fagocitose, obtendo-se uma solução diluindo-se 40 mg de zimosan em 6 ml de PBS e adicionou-se 600 ml de vermelho neutro.

2.1 - Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar, provenientes do biotério central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, com idade inicial de 60 dias e massa corporal aproximado de 200 / 250g. Os animais foram divididos em 8 grupos com 10 animais cada e denominados de Controle (C) sedentários que não eram suplementados, animais sedentários e suplementados com óleo de peixe (N3) ou glutamina (GL) e sedentários e suplementados com ambas as suplementações (N3GL), ratos exercitados (EX) e exercitados suplementados com óleo de peixe (EXN3) ou glutamina (EXGL) e exercitados e suplementados com ambas as suplementações (EXN3GL).

2.2 - Treinamento físico

Após período de adaptação ao meio líquido (30 minutos de natação por dia, durante dois dias, sem uso de sobrecarga), os animais foram submetidos a um programa de treinamento físico. Este consistiu de sessões de 1 hora e 30 minutos de natação, quatro vezes por semana (Seg., Ter., Qui. e Sex.), com sobrecarga de até 6 % da massa corporal (máximo peso considerado como carga aeróbia, equivalente a 70 % de VO_2 max.) (GOBATTO *et al.*, 2001; ROMBALDI, 1996). Após 3 semanas de treinamento foi utilizada sobrecarga de até 6,5 % do peso, confeccionada com bolinhas de chumbo. Para a realização do treinamento foi utilizado um sistema de natação composto por 10 tubos de PVC, com 250 mm de diâmetro e 60 cm de altura, interligados através de uma central de bombeamento e aquecimento de água, comportando um animal por tubo. A temperatura da água foi mantida em 30°C - 32°C, por ser considerada termicamente neutra em relação a temperatura corporal do rato (ROGATTO *et al.*, 2001). O protocolo realizado encontra-se em conformidade com as especificações do comitê de protocolos animais do *American Physiological Society* (KREGEL, *et al.*, 2006); como também; aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal (UFPR) sob número 257 em 30 de agosto de 2007, sob portaria nº 787/03-BL de 11 de junho de 2003 e resolução nº 01/03-BL de 09 de maio de 2003. Os procedimentos referentes a utilização dos animais nesse estudo estavam de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA) e exigências estabelecidas em “*Guide for the Care and Use of Experimental Animals Canadian Council on Animal Care*”.

Tabela 1: Protocolo de exercícios aplicados no estudo.

TREINAMENTO LONGA DURAÇÃO E INTENSIDADE SUBMÁXIMA

		INTERVALO		EXERCÍCIO											TOTAL	SOBRECARGA
															EXERCÍCIO	
ADAPTAÇÃO																
QUARTA		30'												30'	0	
QUINTA		45'												45'	0	
SEXTA		60'												60'	0	
1ª SEMANA		DIA DE TREINAMENTO														
1º DIA	SEG	15'	2'	15'	2'	15'	2'	15'	2'	15'	2'	15'	90'	6%		
2º DIA	TER	20'	2'	20'	2'	20'	2'	20'	2'	10'	2'		90'	6%		
3º DIA	QUI	30'	3'	30'	3'	15'	2'	15'					90'	6%		
4º DIA	SEX	30'	3'	30'	3'	30'							90'	6%		
2ª SEMANA	SEG/TER/QUI/SEX	30'	4'	30'	4'	30'							90'	6%		
3ª SEMANA	SEG/TER/QUI/SEX	30'	4'	30'	4'	30'							90'	6%		
4ª SEMANA	SEG/TER/QUI/SEX	30'	4'	30'	4'	30'							90'	6,5%		
5ª SEMANA	SEG/TER/QUI/SEX	30'	4'	30'	4'	30'							90'	6,5%		
6ª SEMANA	SEG/TER/QUI/SEX	30'	4'	30'	4'	30'							90'	6,5%		
7ª SEMANA	SEG															
	ORTOTANÁSIA															

2.3 - Determinação da lactatemia pós-treinamento

A lactatemia dos animais pós-exercício foi mensurada utilizando-se um lactímetro (modelo Accutrend lactate) e uma gota de sangue coletada da extremidade da cauda dos ratos. Lactatemia foi mensurada, uma vez por semana, todas as sextas-feiras.

2.4 - Suplementação com óleo de peixe e com glutamina

Alguns ratos receberam suplementação com óleo de peixe (AG n-3) na dose de 1 g/kg a partir de 60 dias de idade até um dia antes da ortotanasia. O óleo de peixe foi gentilmente doado pela Fundação Herbárium e é uma preparação de lípides marinhos onde cada cápsula contém 1g de óleo de peixe contendo 192,40 mg de ácido eicosapentaenóico-EPA e 124,10 mg de ácido docosahexaenóico-DHA. As suplementações foram administradas por gavagem.

Outro grupo de ratos recebeu suplementação com glutamina dipeptídeo na dose de 0,125g/kg (Glutimune gentilmente doados pela Nuteral), por gavagem, durante as 6 semanas de treinamento, logo após o treinamento.

2.5 - Mensuração da massa corporal dos animais

Todos os ratos foram pesados diariamente em balança marca Urano, com precisão de 0,1 g., sempre no mesmo horário, para que fossem reajustadas as sobrecargas e a suplementação.

2.6 - Obtenção de Macrófagos

Os macrófagos peritoneais foram obtidos após a ortotanásia dos animais. Após a remoção da pele da região abdominal, 10 mL de tampão fosfato-salina estéril (pH 7,4), foram injetados na cavidade peritoneal dos animais. Após massagem da região abdominal, a cavidade peritoneal foi aberta e o fluido contendo as células foi aspirado com o auxílio de pipeta estéril de plástico tipo Pasteur. Em seguida, estas células foram submetidas a centrifugação (Eppendorf – Centrifuge 5810 R) a 1200 rpm, 4 °C, durante 5 minutos. Os macrófagos então, após descarte do sobrenadante, foram ressuspensos em 3 mL de PBS, para posterior análise de parâmetros imunitários de fagocitose, volume lisossomal e produção de radicais ânion superóxido, peróxido de hidrogênio.

2.7- Obtenção de neutrófilos

O isolamento de neutrófilos foi realizado conforme proposto por BØYUM (1976). O sangue dos animais foi coletado em tubos tipo falcon contendo anticoagulante (EDTA) e mantido sob refrigeração. Posteriormente, o sangue foi centrifugado no próprio tubo a 1.200 rpm a 4°C por 10 min. O plasma foi separado e o restante do sangue, transferido para tubo tipo falcon de 50 mL, acrescentando-se o mesmo volume em PBS. Em tubos contendo 3 mL de Ficoll-Paque PLUS foi acrescentado 8 mL do sangue diluído em PBS. Os tubos foram centrifugados a 1.400

rpm a 18°C durante 40 min. A camada superior transparente composta por células mononucleares e plaquetas foi desprezada.

A camada inferior constituída por hemácias e células polimorfonucleares foi transferida para outro tubo. Submeteu-se a amostra, duas vezes, à lise hipotônica por incubação com solução hemolítica (Tris base (tris[hidroximetil]aminometano) 17,0 mM; NH₄Cl 18,7 mM) em banho-maria a 37°C por 15 min. A solução foi centrifugada a 1.200 rpm por 10 min. O sobrenadante foi desprezado e as células, ressuspendidas em PBS e contadas em câmara de Neubauer.

2.8 - Determinação da produção de peróxido de hidrogênio

A produção de peróxido de hidrogênio foi mensurada utilizando-se o método descrito por PICK e MIZEL (1981) modificado. Através da oxidação de vermelho fenol foi possível detectar a produção de H₂O₂. Alíquotas de 100 µl de solução de macrófagos foram colocadas em placas com 96 poços. Após 1 hora de incubação no escuro (para prevenir a foto-oxidação), o sobrenadante foi descartado por inversão da placa e os pocinhos receberam 100 µl da solução de vermelho fenol contendo horseradish peroxidase e zimosan. Em seguida os macrófagos foram incubados por mais 30 minutos e após o término deste tempo foi executada a leitura a 620 nm em leitor de microplaca (Bio-rad Benchmark). Os resultados estão expressos em µmol / 2 x 10⁵ células⁻¹

2.9 - Mensuração do ânion superóxido

A geração de ânion superóxido foi determinada através da redução de “nitroblue tetrazolium” (NBT – Sigma), que é um composto amarelo, lipossolúvel, que se torna insolúvel e de cor azul no seu estado reduzido (MADHAVI *et al.*, 1994). Os macrófagos (450 µL) foram incubados por 1 hora com 0,1% de NBT a 37 °C. Esta reação foi interrompida pela adição de um volume igual de ácido acético glacial e centrifugada rapidamente (30 segundos a 10.000 rpm) e o NBT reduzido, presente no sedimento, foi solubilizado em 900 µL de ácido acético a 50% e sonificado (1 pulso de

30"). Os restos celulares foram sedimentados e a absorbância do sobrenadante determinada a 550 nm em espectrofotômetro (Ultrospec – 2000). Os dados estão expressos em absorbância / 2×10^5 células⁻¹

2.10 - Determinação de volume lisossomal

Para esta análise utilizou-se o método descrito por PIPE *et al.* (1995), onde em placas de 96 perfurações depositou-se 100 µL da solução, contendo 10⁵ células e 20 µL de solução estoque de vermelho neutro (20 mg de vermelho neutro em 1 mL de DMSO) a 2%. Após 30 minutos, a placa foi centrifugada por 5 minutos a 1.500 rpm. O sobrenadante foi descartado e os orifícios lavados com PBS, para eliminar o vermelho neutro que não foi internalizado pelas células. Foram 100 µl de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro que estava dentro dos lisossomos. Após 30 minutos, a placa foi lida a 550 nm utilizando leitor de placas (Microplate reader Bio-rad - Benchmark). Os dados foram expressos em absorbância / 2×10^5 células.

2.11- Atividade fagocítica

Utilizou-se o método descrito por Bonatto *et al.* (2004). Da solução peritoneal foram depositados 100 µL contendo 2×10^5 células em placa de 96 perfurações e adicionou-se 10 µL de zymosan corado com vermelho neutro e incubou-se por 30 minutos. Após, foram adicionados 100 µL de fixador. Após 30 minutos, a placa foi lavada com PBS e centrifugada por 5 minutos a 1.500 rpm. O vermelho neutro que está dentro dos fagossomos foi então solubilizado utilizando-se 100 µL de solução de extração e após 30 minutos procedeu-se a leitura em leitor de microplacas (Bench Mark –Biorad). Os dados foram expressos em absorbância / 2×10^5 células.

2.12 - Obtenção e contagem dos linfócitos

Os linfócitos foram obtidos do timo e dos linfonodos mesentéricos. Esses tecidos foram separados com o auxílio de duas malhas de aço, conforme descrito por VIEIRA *et al.* (1990). Após, as células em solução salina foram filtradas em papel filtro Whatman (nº 105) e centrifugadas (1.200 rpm, 4 °C) por duas vezes durante 10 minutos. Uma alíquota de células foi retirada para contagem em câmara de Neubauer usando azul de tripan a 0,1%.

2.13 - Proliferação linfocitária

Uma vez isolados os linfócitos (2×10^5 células por poço) foram cultivados em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e na presença de antibióticos (penicilina 10.000 U e estreptomicina 10 mg/L), em placas de 96 wells (volume final de 200 µL), a 37° C em atmosfera de 95% O₂ / 05% CO₂, por 72 horas. Os linfócitos foram estimulados com 20 µL/poço de solução do mitógeno Concanavalina A (Con A), estimulador da proliferação de linfócitos T. Após este período, as células foram contadas em citometria de fluxo, durante 30 s. Os dados foram expressos em porcentagem do controle sem estimulação.

2.14 - Determinação do conteúdo de glicogênio hepático.

O conteúdo de glicogênio foi determinado segundo LEIGHTON *et al.* (1989), adaptado. Do fígado, aproximadamente 90 mg foram retirados e colocados em tubos de ensaio contendo 500 µL de KOH 1M e deixados em banho a 70 °C por 30 minutos, para a digestão do tecido. Após o banho, as amostras foram homogeneizadas em vórtex, e pipetados 100 µL em outros tubos para microcentrifuga contendo 17,5 µL de ácido acético glacial e 500 µL de tampão acetato contendo amiloglucosidase 0,1%, e submetidas ao banho-maria (37 °C) por 3 horas. Ao final deste período as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm, e 100 µL de cada amostra foi colocada

em novos tubos de ensaio contendo 1 ml do tampão Trietanolamina (TEA). Após 40 minutos as amostras foram lidas no espectrofotômetro (Ultrospec – 2000) em comprimento de onda de 340 nm.

2.15 - Análise estatística

Os dados estão expressos como média \pm e.p.m. e foram submetidos à análise de variância de duas vias, tendo como variáveis a suplementação e exercício, seguidos do pós-teste de Bonferroni, com nível de significância para $p < 0,05$.

3.0 - RESULTADOS

3.1 - MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS

A massa corporal dos animais no início e final do experimento está apresentada na tabela 2. Todos os animais ao final de 6 semanas apresentaram ganho de massa significativa quando comparada ao dia 1º do treinamento. Os animais do grupo controle (C) tiveram ganhado de 30% enquanto o exercitado (EX) 23%. No sedentário suplementado com óleo de peixe (N3) o ganho de massa foi de 31% e no suplementado exercitado foi de 21%. No sedentário suplementado com glutamina (GL) o ganho de massa foi de 29% enquanto que no exercitado e suplementado (EXGL) foi de 29%, Finalmente no sedentário suplementado com óleo de peixe e glutamina (N3GL) o ganho de massa corpórea foi de 37% e no exercitado e suplementado (EXN3GL) foi de 21%.

Tabela 2: Massa corporal dos animais dos grupos sedentários e exercitados (C e EX) suplementados com óleo de peixe (N3 e EXN3), glutamina (GL e EXGL) e suas associações (N3GL e EXN3GL), no início do treinamento e ao final de seis semanas.

Grupos	Massa corporal inicial (g)	Massa corporal final (g)	Diferença (g) e (%)	(n)
C	270, 0 ± 10,9	352,0 ± 9,4*	82 e (30 %)	10
N3	263,5 ± 3,4	344,6 ± 6,3*	81 e (31 %)	10
GL	269,3 ± 10,8	346,3 ± 7,7*	77 e (29 %)	12
N3GL	263,6 ± 5,8	361,7 ± 8,5 *	98 e (37 %)	12
EX	263,2 ± 6,3	325,4 ± 12,4*	62 e (23 %)	8
EXN3	267,3 ± 9,9	322,5 ± 12,8	55 e (21 %)	9
EXGL	269,3 ± 10,8	346,3 ± 7,8*	77 e (29 %)	11
EXN3GL	283,3 ± 7,3	328,6 ± 10,4*	45 e (16 %)	12

* p < 0,05 quando comparado a massa corporal inicial.

3.2 - LACTATO SÉRICO

Os resultados obtidos no lactato sérico e imediatamente após o exercício estão apresentados na tabela 3. Os ratos do grupo sedentário tinham a lactatemia em média inferior a 3 mmol/L. Os animais submetidos a exercício físico foram mensurados ao longo de todas as semanas e a lactatemia foi sempre superior a 4 mmol/L. (GOBATTO, 2001).

Tabela 3: Resultados de lactato sérico (mmol) obtidos imediatamente após o exercício durante as seis semanas.

Ação		ADAP.	1ª SEM.	2ª SEM.	3ª SEM.	4ª SEM.	5ª SEM.	6ª SEM.	MENOR	MAIOR	MÉDIA
Exercício	Rato 1	4,1	4,1		4,3	6,3	4,9	4,9	4,1	6,3	4,8
Glutamina	Rato 2	3,9	4,1	5,1	5,1	4,2	8,7	4,9	3,9	8,7	5,1
N3	Rato 3	4,3	6,3		5,9	3,9	4,7	4,7	3,9	6,3	5,0
Glutamina/N3	Rato 4	4,3	4,1	4,7	5,0	4,7	4,6	4,3	4,1	5,0	4,5
SOBRECARGA		6%	6%	6%	6,0%	6,5%	6,5%	6,5%			

CONTROLE											
Sedentário	Rato 5	3,0	3,6	2,2	3,2				2,2	3,6	3,0

Concentração de lactato sérico obtido em um rato por grupo de exercício, medido sempre no último dia de treinamento em cada semana, adaptação e treinamento. As sobrecargas foram alteradas na 4ª semana de treinamento passando de 6 para 6,5 %. Coletou-se lactato de apenas um rato de grupo sedentário para parâmetro com os demais.

3.3 - PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

3.3.1 - Concentração plasmática de glicose

A suplementação com óleo de peixe (N3), glutamina (GL) ou ambas, seja nos animais sedentários ou exercitados não alterou a glicemia dos animais (Figura 8).

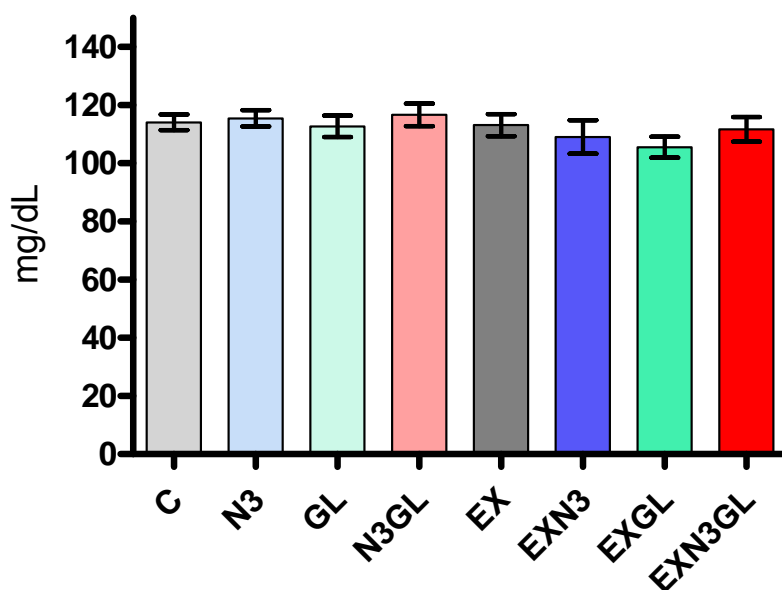


Figura 8: Concentração plasmática de glicose dos ratos sedentários (C), sedentários suplementados com óleo de peixe (N3), glutamina (GL) ou ambos (N3GL), exercitados (EX), exercitados suplementados com óleo de peixe EXN3, glutamina (EXGL) ou ambos (EXN3GL). Os dados representam a média de 3 experimentos com 10 animais por grupo.

3.4 - PARÂMETROS DE IMUNIDADE INATA

3.4.1 – Fagocitose pelos macrófagos peritoneais

A fagocitose pelos macrófagos peritoneais dos animais sedentários suplementados com óleo de peixe (N3), glutamina (GL) e sua associação (N3GL) foi aproximadamente 3,5 vezes mais quando comparada à dos controle ($P < 0,001$). Todos os macrófagos peritoneais dos animais submetidos ao exercício físico (EX) e às diferentes suplementações (EXN3, EXGL e EXN3GL) também apresentaram aumento de aproximadamente 3 vezes em relação ao controle ($P < 0,001$) mas não foi diferente quando comparada à dos N3, GL e N3GL ($P > 0,05$).

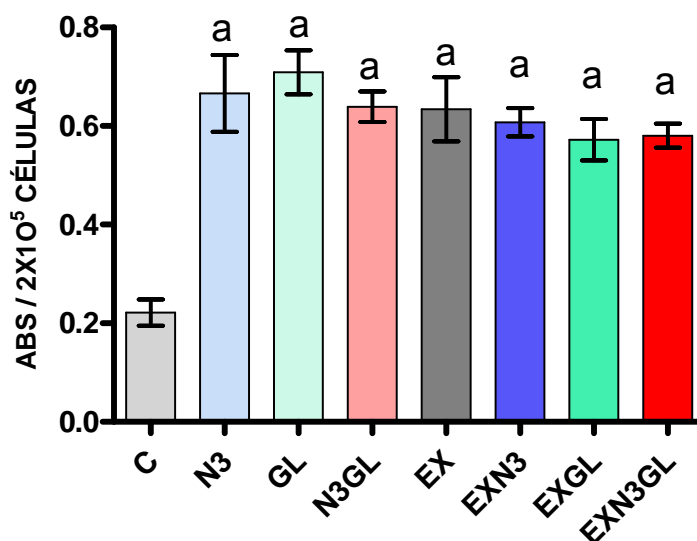


Figura 9: Fagocitose dos macrófagos peritoneais obtidos dos ratos sedentários (C), sedentários suplementados com óleo de peixe (N3), glutamina (GL) ou ambos (N3GL), exercitados (EX), exercitados suplementados com óleo de peixe EXN3, glutamina (EXGL) ou ambos (EXN3GL). Os dados representam a média de 3 experimentos com 10 animais por grupo.

^a $p < 0,001$ vs. controle.

3.4.1 – Volume lisossomal dos macrófagos peritoneais

Macrófagos peritoneais dos ratos sedentários suplementados com óleo de peixe (N3) apresentaram volume lisossomal 34 % maior ($p < 0,01$) quando comparado ao do grupo controle (C). A suplementação com glutamina (GL) promoveu leve elevação mas não foi significativa ($P > 0,05$ vs. C). A associação das suplementações de com óleo de peixe e glutamina (N3GL) também levou ao aumento do volume lisossomal de 38 % ($p < 0,01$) quando comparado ao controle e GL, mas não foi diferente do N3 .

A atividade física (EX) também promoveu aumento no volume lisossomal de 43 % ($p < 0,0002$) na comparação ao grupo controle (C). A associação de exercício e óleo de peixe (EXN3) foi similar à do N3 ($p > 0,05$) mas inferior à do EX ($p < 0,05$). A suplementação com glutamina (EXGL) e de ambas as suplementações (EXN3GL) promoveram aumento de 30 % no volume lisossomal em relação ao grupo EX e EXN3.

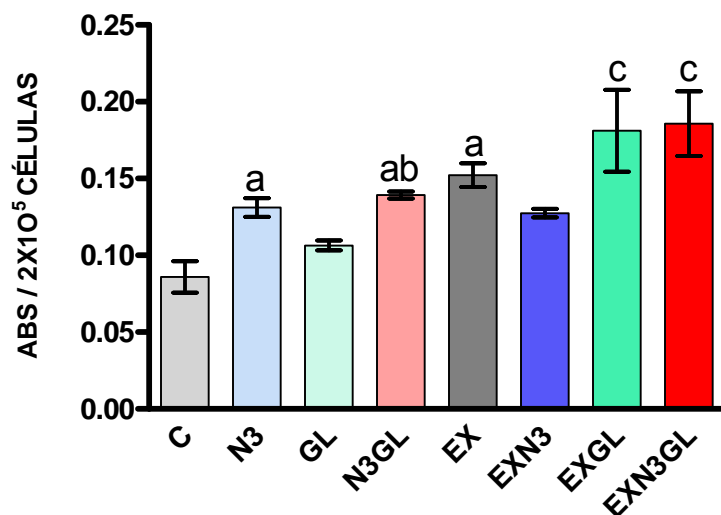


Figura 10: Volume lisossomal dos macrófagos peritoneais obtidos dos ratos sedentários (C), sedentários suplementados com óleo de peixe (N3), glutamina (GL) ou ambos (N3GL), exercitados (EX), exercitados suplementados com óleo de peixe EXN3, glutamina (EXGL) ou ambos (EXN3GL). Os dados representam a média de 3 experimentos com 10 animais por grupo.

^a $p < 0,0002$ quando comparado ao controle.

^b $p < 0,01$ quando comparado ao GL.

^c $p < 0,001$ vs. EXN3.

3.4.3 – Produção de ânion superóxido pelos macrófagos peritoneais.

A suplementação com óleo de peixe (N3), glutamina (GL) e ambas as suplementações, seja nos animais sedentários ou exercitados não alterou a produção de ânion superóxido pelos macrófagos peritoneais dos animais.

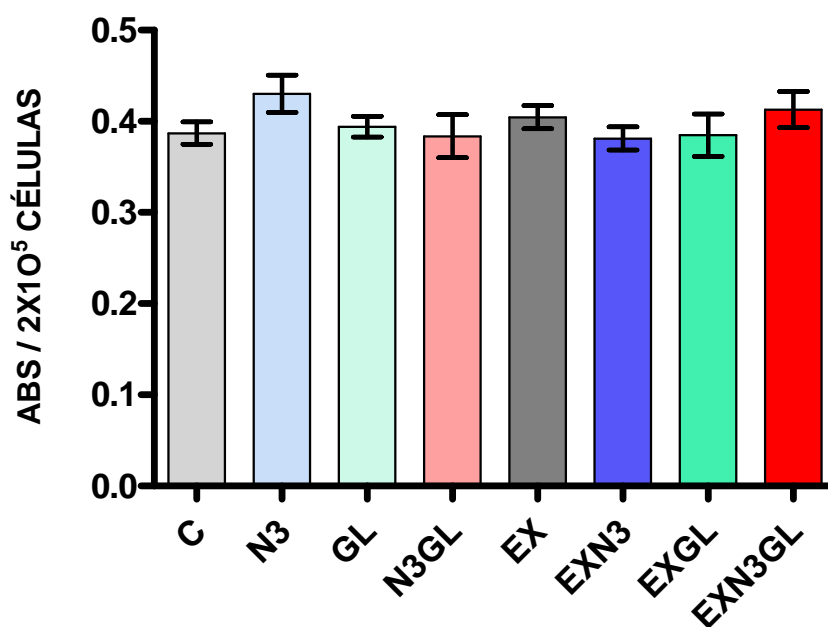


Figura 11: Produção do ânion superóxido pelos macrófagos peritoneais obtidos dos ratos sedentários (C), sedentários suplementados com óleo de peixe (N3), glutamina (GL) e ambas (N3GL), exercitados (EX), exercitados suplementados com óleo de peixe EXN3, glutamina (EXGL) e ambas (EXN3GL). Os dados representam a média de 3 experimentos com 10 animais por grupo.

3.4.4 - Produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais.

A produção de H_2O_2 (abs. 2×10^5 cels.) pelos macrófagos peritoneais obtidos de animais sedentários (C) foi de $0,280 \pm 0,027$, pelos suplementados com óleo de peixe foi de $0,345 \pm 0,019$, com glutamina foi de $0,272 \pm 0,024$ e com ambas as suplementações foi de $0,328 \pm 0,024$. Assim os macrófagos dos animais suplementados com óleo de peixe apresentaram produção de H_2O_2 elevada em 21 % ($p < 0,05$ vs. C), com glutamina não foi diferente da do controle (C) ($p > 0,05$), mas foi menor que a dos com óleo de peixe ($p < 0,01$) e a associação de ambas as suplementações promoveu o mesmo efeito do óleo de peixe isolado ($p < 0,05$ vs. C e GL).

A produção de H_2O_2 pelos macrófagos peritoneais de ratos exercitados, sem suplementação (EX) foi significativamente maior ($0,345 \pm 0,024$), quando comparada à do grupo sedentário (C), representando 13 % de elevação ($p < 0,03$). A suplementação de óleo de peixe produziu H_2O_2 em $0,385 \pm 0,033$, a qual foi similar à do grupo sedentário com óleo de peixe (N3), mas significativamente maior quando comparada à do grupo exercitado (EX) sem suplementação ($p < 0,05$). A suplementação com glutamina induziu a produção de H_2O_2 de $0,340 \pm 0,014$, a qual não foi diferente da dos animais sedentários suplementados (GL) e exercitados (EX), mas inferior ($p < 0,05$) à do suplementado com óleo de peixe e sedentário (N3) e exercitado (EXN3). A associação de ambas as suplementações foi similar à do grupo sedentário (N3GL). Esses dados em conjunto sugerem que tanto em situação sedentária quando exercitada, a presença de óleo de peixe incrementa a produção de H_2O_2 . Ainda, a suplementação com glutamina, *in vivo* na dose utilizada, não alterou a produção de H_2O_2 . Quando de sua associação com óleo de peixe (N3GL), predominou o efeito do óleo de peixe. Finalmente, o exercício físico, isoladamente, foi hábil em incrementar a produção de H_2O_2 quando comparada ao controle. Quanto aos animais exercitados e suplementados com óleo de peixe (EXN3), observou-se incremento ainda maior da produção, tendo assim efeito aditivo ($p < 0,01$). A associação do exercício à suplementação com glutamina (EXGL) ou de ambas (EXN3GL) não promoveu efeito diferente daquele observado pelo exercício ($P > 0,05$).

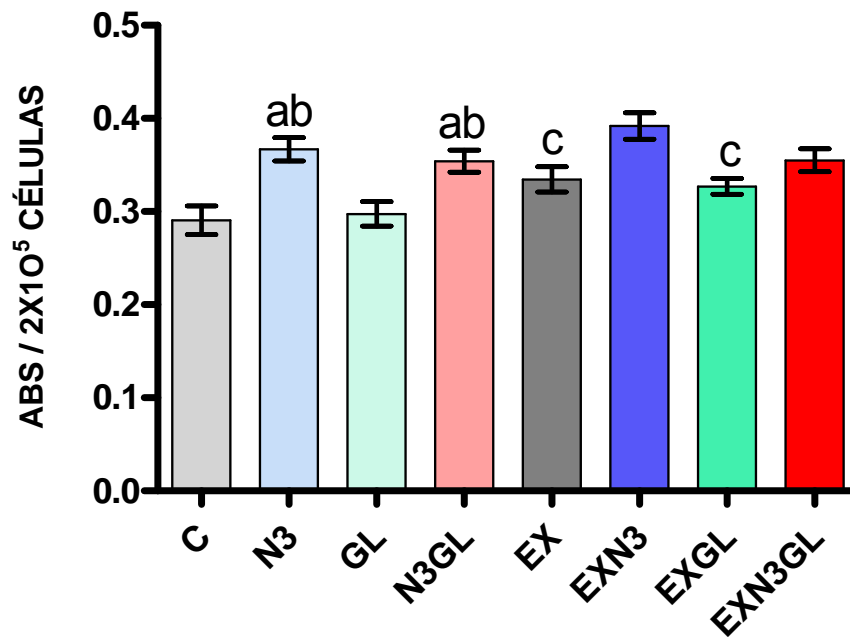


Figura 12: Produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos peritoneais obtidos dos ratos sedentários (C), sedentários suplementados com óleo de peixe (N3), glutamina (GL) ou ambos (N3GL), exercitados (EX), exercitados suplementados com óleo de peixe EXN3, glutamina (EXGL) ou ambos (EXN3GL). Os dados representam a média de 3 experimentos com 10 animais por grupo.

^a N3 $p < 0,001$, N3GL $p < 0,01$ e EX $p < 0,03$ quando comparado ao controle.

^b N3 $p < 0,01$ e N3GL $p < 0,05$ quando comparado ao GL.

^c EX $p < 0,05$ e EXGL $p < 0,01$ quando comparado ao EXN3.

3.4.5 – Fagocitose pelos neutrófilos do sangue

A suplementação com óleo de peixe (N3), glutamina (GL) e ambas, seja nos animais sedentários ou exercitados não alterou a fagocitose pelos neutrófilos circulantes dos animais.

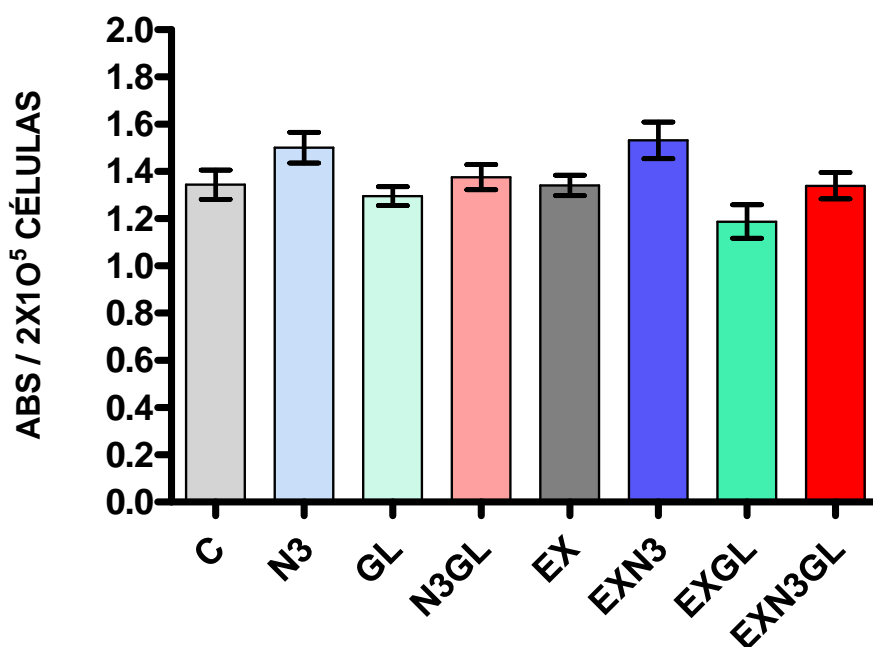


Figura 13: Fagocitose dos neutrófilos obtidos do sangue dos ratos sedentários (C), sedentários suplementados com óleo de peixe (N3), glutamina (GL) e ambas (N3GL), exercitados (EX), exercitados suplementados com óleo de peixe EXN3, glutamina (EXGL) e ambas (EXN3GL). Os dados representam a média de 3 experimentos com 10 animais por grupo.

3.4.6 - Volume lisossomal pelos neutrófilos do sangue

A suplementação com óleo de peixe (N3), glutamina (GL) e ambas, seja nos animais sedentários ou exercitados não alteraram o volume lisossomal dos animais.

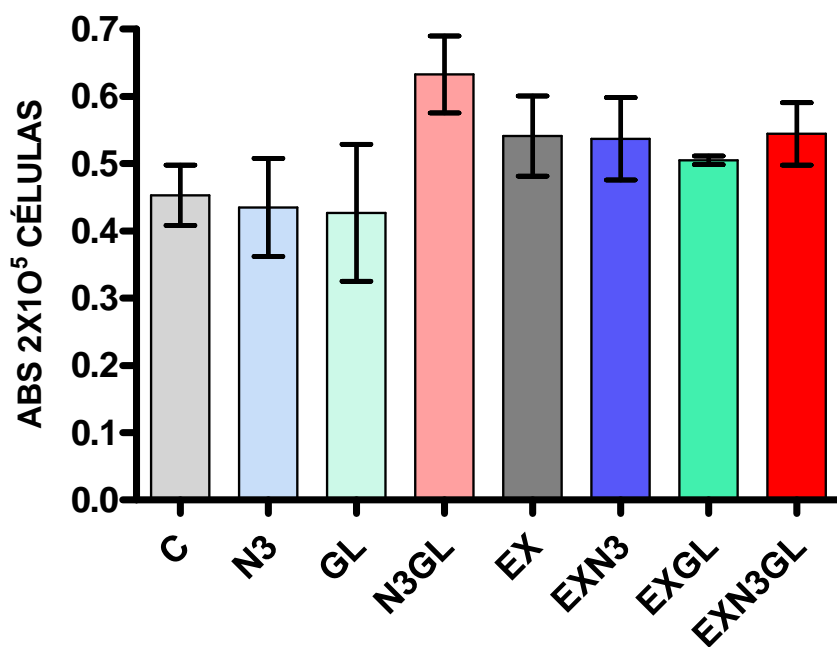


Figura 14: Volume lisossomal dos neutrófilos obtidos do sangue dos ratos sedentários (C), sedentários suplementados com óleo de peixe (N3), glutamina (GL) e ambas (N3GL), exercitados (EX), exercitados suplementados com óleo de peixe EXN3, glutamina (EXGL) e ambas (EXN3GL). Os dados representam a média de 3 experimentos com 10 animais por grupo.

3.4.7 – Produção de ânion superóxido pelos neutrófilos do sangue

A produção de O_2^- pelos neutrófilos sanguíneos obtidos de ratos sedentários e exercitados está apresentada na figura 15. Neutrófilos de ratos sedentários produziram $0,416 \pm 0,039$ (2×10^5 céls.) ânions superóxidos. Ratos sedentários suplementados com óleo de peixe (N3), tiveram a produção de ânion superóxido pelos seus neutrófilos de $0,745 \pm 0,037$, a qual foi 56 % maior quando comparada à do controle ($p < 0,001$). A produção de ânion superóxido pelos neutrófilos do grupo suplementado com glutamina (GL) foi de $0,501 \pm 0,027$, a qual não foi diferente da do controle (C) ($p > 0,05$), mas inferior à do N3 ($p < 0,001$). A associação de ambas suplementações causou efeito similar à do grupo N3 sozinho ($p < 0,01$ vs. C e GL).

Neutrófilos de ratos exercitados sem suplementação (EX) produziram ânion superóxido ($0,752 \pm 0,035$) similar à do grupo N3 e N3GL. Nos grupos exercitados e suplementados com óleo de peixe (EXN3) e glutamina (EXGL), a produção foi de $0,857 \pm 0,024$ e $0,790 \pm 0,033$, respectivamente, as quais não foram diferentes da do grupo exercitado sem suplementação (EX), mas foi maior que à do grupo sedentário suplementado com glutamina (GL) e não diferente da do sedentário suplementado com óleo de peixe (N3). Interessantemente a associação do exercício e ambas as suplementações (EXN3GL) induziram a produção de ânion superóxido para $1,158 \pm 0,019$, a qual foi significativamente maior quando comparada à dos demais grupos.

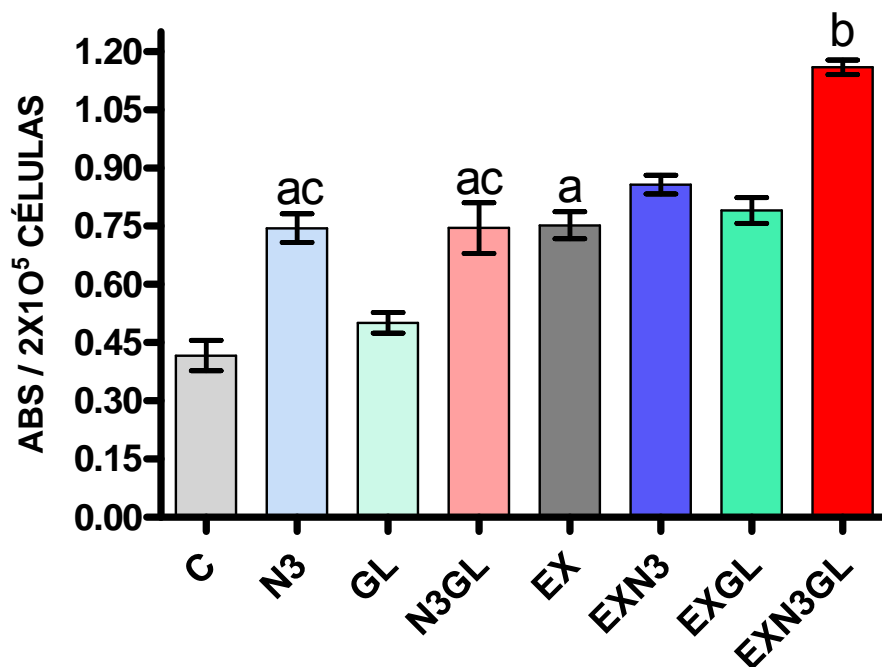


Figura 15: Produção do ânion superóxido pelos neutrófilos obtidos do sangue dos ratos sedentários (C), sedentários suplementados com óleo de peixe (N3), glutamina (GL) de ambos (N3GL), exercitados (EX), exercitados suplementados com óleo de peixe EXN3, glutamina (EXGL) e ambos (EXN3GL). Os dados representam a média de 3 experimentos com 10 animais por grupo.

^a N3, N3GL $p < 0,05$ e EX $p < 0,0001$ quando comparado ao controle.

^b EXN3GL $p < 0,001$ quando comparado ao EX, EXN3 e EXGL.

^c N3 $p < 0,05$ e N3GL $p < 0,01$ quando comparado ao GL.

3.4.8 - Produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos do sangue

A produção de H_2O_2 (abs. / 2×10^5 céls.) pelos neutrófilos obtidos de sangue de ratos controle foi de $0,198 \pm 0,042$. A suplementação de óleo de peixe (N3) elevou esta produção para $0,712 \pm 0,87$, a qual significativamente maior ($p < 0,01$ vs. V). A suplementação com glutamina (GL) e a associação de ambas as suplementações (N3GL) elevou para $0,798 \pm 0,076$ e $0,821 \pm 0,027$, respectivamente, as quais foram estatisticamente diferentes quando comparadas à do controle ($p < 0,001$), mas não foi diferente quando comparada à do N3 ($p > 0,05$). A produção de H_2O_2 pelos neutrófilos dos ratos exercitados sem suplementação (EX) foi de $0,639 \pm 0,060$, a qual foi superior à do controle ($p < 0,01$), mas não foi diferente da dos demais grupos sedentários ($p > 0,05$). A suplementação com óleo de peixe causou efeito aditivo na produção de H_2O_2 , a qual foi significativamente maior quando comparado à de qualquer grupo sedentário ou exercitado ($p < 0,0001$). A produção de H_2O_2 pelos neutrófilos de ratos exercitados e suplementados com glutamina (EXGL) foi similar à do grupo exercitado (EX), não havendo assim o efeito adicional promovido por essa suplementação. Curiosamente, a combinação de exercício e ambas as suplementações induziu a redução de H_2O_2 , quando comparado à do grupo EXN3, mas não foi estatisticamente diferente da de seus pares exercitados.

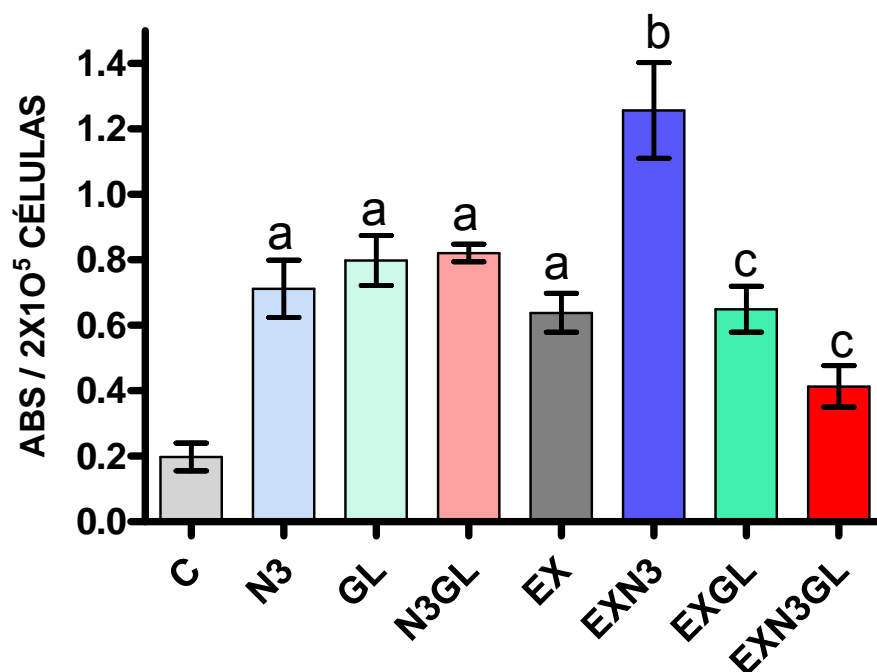


Figura 16. Produção de peróxido de hidrogênio pelos neutrófilos obtidos do sangue dos ratos sedentários (C), sedentários suplementados com óleo de peixe (N3), glutamina (GL) e ambos (N3GL), exercitados (EX), exercitados suplementados com óleo de peixe EXN3, glutamina (EXGL) e ambos (EXN3GL). Os dados representam a média de 3 experimentos com 10 animais por grupo.

^a N3 $p < 0,01$, GL, N3GL $p < 0,001$ e EX $p < 0,0009$ quando comparado ao controle.

^b EXN3 $p < 0,001$ quando comparado ao EX.

^c EXGL e EXN3GL $p < 0,001$ quando comparado ao EXN3.

3.5 - PARÂMETROS DE IMUNIDADE ADAPTATIVA

3.5.1 - Proliferação de linfócitos obtidos do baço

Na ausência de estímulo (proliferação basal) nos grupos sedentários sem e com diferentes suplementações, não houve alteração na proliferação linfocitária ($p > 0,05$). Por outro lado, quando da atividade física sem suplementação (EX) houve elevação significativa da proliferação basal ($p < 0,05$ vs. C). A suplementação com óleo de peixe e glutamina, sozinhas, não provocou efeito adicional na proliferação (EXGL e EXN3), mas a associação de ambas as suplementações com o exercício (EXN3GL) elevou em 1,15 vezes em relação à do C ($p < 0,05$) e em 1,3 vezes em relação à do EX ($p < 0,05$).

Na presença de concanavalina, a proliferação linfocitária no grupo sedentário elevou em 8,2 vezes ($p < 0,001$). Nos grupos suplementados em óleo de peixe N3), glutamina (GL) e ambas as suplementações (N3GL), a proliferação linfocitária elevou aproximadamente 4,6; 5,9 e 4,6 vezes ($p < 0,001$). No grupo exercitado sem suplementação (EX) a elevação da proliferação foi de 5,1 vezes ($p < 0,05$) e no suplementado com óleo de peixe (EXN3), glutamina (EXGL) e ambas as suplementações (EXN3GL) foi de 5,4; 4,6 e 4,9 vezes, respectivamente ($p < 0,001$).

Tabela 4: Proliferação de linfócitos (com) obtidos de baço dos ratos controle (C), suplementado com óleo de peixe (N3), suplementado com glutamina (GL), suplementado com óleo de peixe e glutamina (N3GL), Exercitado (EX), Exercitado e suplementado com óleo de peixe (EXN3), Exercitado e suplementado com glutamina (EXGL) e exercitado e suplementado com óleo de peixe e glutamina (EXN3GL) na ausência e presença de concanavalina A. Os dados estão apresentados como média \pm erro padrão médio.

Grupo	sem estímulo (cpm)	Con-a (cpm)
C	281,6 \pm 20,6	2324,1 \pm 142,9*
N3	378,5 \pm 19,1	1761,4 \pm 249,6*
GL	310,9 \pm 47,7	1837,5 \pm 151,4*
N3GL	325,6 \pm 21,6	1500,5 \pm 102,2*
EX	374,0 \pm 29,0 ^a	1942,7 \pm 276,6*
EXN3	470,0 \pm 54,6 ^a	2574,1 \pm 428,6*
EXGL	400,9 \pm 40,0 ^a	1879,4 \pm 604,7*
EXN3GL	502,0 \pm 61,9 ^{ab}	2475,3 \pm 483,6*

* $p < 0,05$ vs. ausência de estímulo; ^a $p < 0,05$ vs. C; ^b $p < 0,05$ vs. EX;.

3.5.2 - Proliferação de linfócitos obtidos do timo

A proliferação de linfócitos sem estímulo dos animais sedentários (C, N3, GL e N3GL) e exercitados (EX, EXN3, EXGL e EXN3GL) não foi diferente na ausência de estímulo ($p > 0,05$). Na presença de con-A, no grupo controle (C) a proliferação elevou-se em 2,7 vezes ($p < 0,05$). A suplementação com óleo de peixe (N3) elevou a proliferação em 9,9 vezes, com glutamina (GL) em aproximadamente 11,5 vezes e a associação de ambas as suplementações elevou em 15,5 vezes ($p < 0,001$).

Os linfócitos dos ratos dos grupos exercitados (EX) apresentaram proliferação aumentada em 6,5 vezes ($p < 0,001$). A suplementação com óleo de peixe dos animais exercitados (EXN3) induziu ao aumento de 20,1 vezes e com glutamina (EXGL) 5,3 vezes. A associação de ambas as suplementações (EXN3GL) elevou a proliferação em 24,2 vezes.

Tabela 5: Proliferação de linfócitos (com) obtidos do timo de ratos dos grupos controle (C), suplementado com óleo de peixe (N3), suplementado com glutamina (GL), suplementado com óleo de peixe e glutamina (N3GL), Exercitado (EX), Exercitado e suplementado com óleo d peixe (EXN3), Exercitado e suplementado com glutamina (EXGL) e exercitado e suplementado com óleo de peixe e glutamina (EXN3GL). Os dados estão apresentados como média e erro padrão médio.

Grupo	Sem estímulo (cpm)	Con-a (cpm)
C	162,0 \pm 17,3	445,2 \pm 27,2*
N3	171,0 \pm 16,3	1690,5 \pm 158,0 ^a
GL	144,2 \pm 11,4	1658,2 \pm 129,5 ^a
N3GL	153,4 \pm 12,9	2372,5 \pm 494,1 ^a
EX	164,8 \pm 12,8	1066,1 \pm 132,0 ^{ab}
EXN3	159,5 \pm 13,1	3197,5 \pm 294,9 ^b
EXGL	178,8 \pm 10,3	946,5 \pm 161,0 ^b
EXN3GL	191,3 \pm 19,0	4641,6 \pm 160,5*

* $p < 0,05$ vs. ausência de estímulo

^a $p < 0,0002$ vs. C

^b $p < 0,001$ vs. EXN3GL

3.5.3 - Proliferação de linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico

A proliferação dos linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico dos animais sedentários (C, N3, GL e N3GL) e exercitados (EX, EXN3, EXGL e EXN3GL) não foi diferente na ausência de estímulo ($p > 0,05$). Na presença de con-A, os linfócitos do grupo sedentário (C) aumentou a proliferação em 2,6 vezes ($p < 0,05$). A suplementação com óleo de peixe (N3) elevou a proliferação em 4,5 vezes ($p < 0,05$) e com glutamina (GL) em 2 vezes ($p < 0,05$). A associação de ambas as suplementações elevou a proliferação em 3,9 vezes ($p < 0,001$) similar à do óleo de peixe sozinho ($p < 0,05$), mas superior à da glutamina (GL) isoladamente e controle (C) ($p < 0,001$). A prática do exercício físico (EX) incrementou a proliferação celular significativamente (2,2 vezes). A suplementação com óleo de peixe do grupo exercitado (EXN3) elevou a proliferação em 3,6 vezes e a suplementação com glutamina (EXGL) em 2,8 vezes. A associação de ambas as suplementações com exercício elevou a proliferação linfocitária em 4,9 vezes, havendo efeito aditivo.

Tabela 6: Contagens por minuto (com) de proliferação de linfócitos de linfonodo mesentérico sem estimulação e com estimulação de concanavalina A dos grupos controle (C), suplementado com óleo de peixe (N3), suplementado com glutamina (GL), suplementado com óleo de peixe e glutamina (N3GL), Exercitado (EX), Exercitado e suplementado com óleo de peixe (EXN3), Exercitado e suplementado com glutamina (EXGL) e exercitado e suplementado com óleo de peixe e glutamina (EXN3GL). Os dados estão apresentados como média e erro padrão médio.

Grupo	Sem estímulo (cpm)	Con-a (cpm)
C	165,0 ± 14,8	433,0 ± 17,1*
N3	156,6 ± 10,8	702,3 ± 48,2* ^{ab}
GL	143,0 ± 15,0	287,0 ± 42,9* ^a
N3GL	162,0 ± 16,2	632,0 ± 46,3* ^{ab}
EX	176,0 ± 22,5	394,5 ± 18,9*
EXN3	143,1 ± 13,6	518,9 ± 89,5*
EXGL	180,6 ± 22,9	516,8 ± 164,3*
EXN3GL	165,5 ± 12,0	822,6 ± 99,9* ^c

* $p < 0,05$ vs. ausência de estímulo

^a $p < 0,01$ vs. C

^b $p < 0,001$ vs. GL

^c $p < 0,05$ vs. EX.

4.0 - DISCUSSÃO

Dependendo do tipo de exercício físico pode haver ganho ou perda de massa corpórea onde os exercícios anaeróbios promovem ganho de massa, em particular o tecido muscular, e os aeróbios promove perda de massa, em particular a massa gorda (tecido adiposo). De fato, animais submetidos a presente protocolo de atividade física, aeróbio, (tabela 1) tiveram menor ganho de massa quando comparados aos sedentários. Esses dados são similares aos de Braga e Gobatto (2002), os quais argumentam tal achado pela elevada lipólise promovida pelos hormônios contra-regulatórios (catecolaminas, glucagon e corticóides). Ainda, pela possível elevação de até 20% no gasto energético durante o repouso quando comparados com os indivíduos sedentários, provavelmente pela maior atividade simpática induzida pelo exercício.

Para qualquer experimentador afirmar a qual nível de intensidade física seus animais estão sendo submetidos, o mais acurado método é pela mensuração direta do consumo de oxigênio (GLADEEN, 2004). Uma forma indireta, bioquímica, é pela mensuração da lactatemia (GOBATTO, 2001). Os animais submetidos à atividade física apresentaram valores de lactatemia superior a 4 mmol/L quando comparados aos dos sedentários cujos valores foram inferiores a 3 mmol/ L (tabela 3). Estes dados corroboram os achados de MANCHADO E GOBATTO (2005), que adicionalmente utilizam este parâmetro como divisor de diferentes sistemas de transição metabólica (anaeróbio x aeróbio), onde o valor determinados por eles é o de 3,9 mmol/L.

A prática de atividade física regular tem sido mostrada ter a habilidade de modular a resposta imunitária, onde exercício leve a moderado é imunomodulador e o de longa duração e alta intensidade é imunodepressora. Destas observações foi concebido o gráfico em forma de “J” o qual relaciona suscetibilidade às infecções virais com volume e intensidade de atividade física praticada (NIEMMAN, 1997, COSTA ROSA, 2005). Ainda, os resultados publicados até o momento misturam estudos onde os animais foram ortotansados logo após a última sessão de treinamento ou 24-72 horas pós-exercício (COSTA ROSA, 2002; GLEESON, 2007; FEBRAIO, 2007). Com o intuito de isolarmos o efeito das alterações metabólicas, neurais e hormonais, nosso

protocolo experimental optou por ortotanasiar os animais 48 horas pós-exercício, onde o organismo já teria alcançado total estado de repouso. Esta condição pode ser comprovada ao analisarmos um importante parâmetro metabólico, a glicemia (Figura 8), a qual não foi diferente entre os grupos sedentários e exercitados. Assim, os dados referentes ao funcionamento do sistema imunitário, aqui investigados, são devidos do grau de aptidão física e, portanto isolamos qualquer interferência promovida por fatores neurais e/ou humorais, que sabemos também alteram a funcionalidade do sistema imunitário (SILVA e GOBATTO, 2006; COSTA ROSA, 2002; PEDERSEN, 2001; NIEMMAN, 1990).

De fato, várias funções das células de defesa estão temporariamente suprimidas, após sessão agudas de exercício moderado a intenso prolongado. Isto está acoplado a elevação dos hormônios contra-reguladores (catecolaminas, cortisol e glucagon) e de citocinas em particular a interleucina-6. Isto tudo, atualmente, estão diretamente relacionados à diminuição da imunidade mediada por células pós-exercício.

Característica única observada logo ao início de qualquer atividade física é a alteração do número de leucócitos circulantes (LAGRANHA *et al.*, 2007). Leucocitose ocorre logo nos primeiros minutos de exercício físico, caracterizada principalmente pela neutrofilia, linfocitofilia e aumento de células NK (NAGATOMI, 2006). Macrófagos, da mesma forma que neutrófilos, também constituem uma importante parte da primeira linha de defesa contra invasores microbicidas e neoplásicos de natureza fagocítica, citotóxica e de diminuição da capacidade intracelular. São importantes também com antígeno-apresentador de células. No que se referem à influência do exercício as funções dos macrófagos induzem o aumento da quimiotaxia, aderência, explosão respiratória e fagocitose. A literatura também demonstra que essas características dos macrófagos 72 HORAS após exercício e apresentadas em diferentes tempos (15, 30, 60 e 120 minutos) em ratos (SUGIURA, 2001).

De fato, as células fagocíticas de nossos animais tiveram comportamento interessante. Os macrófagos de todos os grupos estudados apresentaram elevação da fagocitose, seja pela suplementação com glutamina (GL), óleo de peixe (N3), associação de ambas (N3GL) ou da atividade física (EX, EXGL, EXN3, EXN3GL). O mesmo pode ser observado em relação ao volume lisossomal. Como a célula fagocítica

é ativada (no caso o macrófago), seu turnover de membrana ocorre em 30 minutos. Para tanto, ela precisa de energia onde a glutamina é importante aminoácido para o ciclo de Krebs (NEWSHOLME e CURI, 2003). O produto fagocitado é então levado ao lisossomo para posterior degradação (BONATO *et al.*, 2004). Interessantemente, outra importante célula fagocítica, o neutrófilo, não foi observado o mesmo fenômeno na fagocitose e volume lisossomal. Assim, talvez a explicação para este achado e o da literatura pode ser no “timing” de obtenção destas células onde nós colhemos 48 horas pós exercício e a maioria dos estudos logo após a última sessão de exercício.

Foi demonstrado que os neutrófilos circulantes tem redução da responsividade à LPS por até várias horas após exercício, responsividade esta caracterizada pela menor produção de EROs e degranulação deficitária (Robson *et al.*, 1999). Nossos dados, por sua vez, mostram que há uma alteração da resposta destas duas células fagocíticas. No macrófago, a produção de ânion superóxido não se alterou enquanto que no neutrófilo, com exceção do controle (C) e da suplementação com glutamina (GL), todos os demais grupos tiveram elevação da produção de ânion superóxido. Já a produção de peróxido de hidrogênio nos macrófagos estava elevada em todos os grupos (exceto controle e GL) e nos neutrófilos em todos quando comparados ao controle e interessantemente houve uma produção maior quando se associou o exercício ao óleo de peixe. A resposta de neutrófilos ao exercício crônico está na dependência da intensidade do treinamento. Assim, o exercício moderado acarreta aumento dessas células, que se mantém mesmo durante o repouso. Exercício de alta intensidade provoca queda do número de neutrófilos (PEDERSEN e TOFT, 2000). Quanto à capacidade funcional, existe uma grande controvérsia na literatura e, enquanto alguns autores demonstram diminuição da produção dos reativos de oxigênio e diminuição da capacidade microbicida, outros autores demonstram maior capacidade quimiotática e da fagocitose, com diferenciações entre grupos treinados e sedentários na proteção, recuperação e restituição de células musculares vermelhas. Esses dados, embora contraditórios, não são excludentes e podem decorrer de diferenças metodológicas (COSTA ROSA, 2002; MOROZOV, 2006).

Qual é o significado desta alteração das células fagocíticas? Porque macrófagos e neutrófilos tiveram comportamento diferente? A resposta para estas

questões é complexa e não há uma única versão. Sabemos que por trás da ação das células imunitárias está, entre outros, a resposta do tecido muscular esquelético. De fato, no primeiro momento, sabemos a produção de EROs pelas células fagocítica no início da inflamação é potencial agravante de lesões. Isto inicialmente pode parecer paradoxal, mas sabemos que na seqüência há secreção de fatores de crescimento, pelas próprias células imunitárias, necessários para o adequado reparo e desenvolvimento do tecido muscular esquelético. Em resumo, a inflamação se inicia após uma leve lesão e termina após o reparo desta, onde participam deste processo vários mecanismos, entre os mais importantes estão a angiogênese, cicatrização, remodelamento/regeneração tecidual e formação de nova matriz tecidual. Paralelo a isto, este processo altamente complexo de inflamação mantém patógenos invasores sobre controle (QUINTANA; COHEN, 2005).

Em pesquisa realizada com mulheres judocas, avaliaram-se as diferenças funcionais de neutrófilos em exercício aeróbico e anaeróbico antes, após e 24 horas após o exercício, demonstrando que não haver prejuízo na função de neutrófilos (WOLLACH, 2000).

Linfócitos são os componentes primários do sistema imune adaptativo através de seus subtipos T e B (PEDERSEN e TOFT, 2000). A determinação da resposta proliferativa de linfócitos na estimulação com vários agentes mitógenos in vitro é considerada uma avaliação com respaldo de sua capacidade funcional (NIEMAN, 1997).

A linfocitofilia que ocorre durante a prática de atividade física intensa ou prolongada é seguida por linfocitopenia característica, iniciada logo ao fim da sessão de treinamento. Esta característica pode durar por até 24 horas após a atividade física e pode vir acompanhada de redução da razão $CD4^+/CD8^+$ (NAGATOMI, 2006). Isto mais uma vez, reforça nossa estratégia de coletar as células após 48 horas após a última sessão de treinamento, para evitar que “fatores agudos” interfiram na interpretação dos resultados.

A prática de exercício físico em intensidades moderadas durando 2h/dia, reduz o risco de adquirir ITRS em 29% quando comparada à indivíduos sedentários (MATTHEWS et al., 2002). Entretanto, outros estudos mostram associação entre

redução da função imunológica e aumento da carga de trabalho, que tem correlação direta com o aumento na suscetibilidade à ITRS (DAVIS *et al.*, 2004). Estudo realizado por SANTOS e COSTA ROSA (2007), demonstrou não haver diminuição de proliferação de linfócitos em ratos ortotansados imediatamente após treinamento aeróbico de alta intensidade. Assim, dependendo da abordagem metodológica, mesmo em exercícios de intensidade similares, tem sido mostrado haver resultados antagônicos.

Da mesma forma que observamos nas células fagocíticas, os linfócitos obtidos de diferente órgão linfóides secundários também tiveram comportamento diferente. A taxa de proliferação basal das células de defesa é importante fator para se determina o índice de proliferação. Ela ainda nos fornece o grau de magnitude de resposta das células do sistema adaptativo o adquirido. Ao investigarmos a proliferação, no estado basal, dos linfócitos obtidos do timo e do linfonodo mesentérico (Tabelas 5 e 6), seja nos grupos sedentários seja nos exercitados, não encontramos diferença entre os grupos. Já os linfócitos obtidos do baço de animais do grupo exercitado (Tabela 4) apresentaram proliferação basal significativamente maior quando comparada à dos sedentários. Isto sugere que a prática de atividade física *per se* tem papel de incrementar a proliferação basal e a suplementação com as diferentes dietas e suas associações não incrementaram esta proliferação. Ainda, a proliferação basal dos linfócitos do baço foi praticamente o dobro da observada nos linfócitos dos outros dois órgãos linfóides.

Quando do desafio com o mitógeno concanavalina-A, estimulador de linfócitos T, temos que a proliferação linfocitária nestes diferentes órgãos também foi diferente. Inicialmente, no baço (Tabela 4) temos que no controle houve aumento de proliferação de 8 vezes no controle e a suplementação com óleo de peixe reduziu esta em 50% (4 vezes). Com glutamina foi elevação de 6 vezes e a associação de ambas as suplementações fez prevalecer o efeito do óleo de peixe (4 vezes). Já na prática de atividade física a média foi ao redor de 5 vezes. Portanto, temos nestes linfócitos um comportamento, se comparado ao animal controle, imunomodulação para baixo, ou seja, no sentido de reduzir a resposta proliferativa, que pode ser traduzida como imunodepressão. Na Tabela 5 temos a proliferação dos linfócitos do timo, onde obtivemos dados totalmente opostos àqueles obtidos para o baço. No controle a

resposta proliferativa praticamente triplicou e com a suplementação com óleo de peixe (N3) ou glutamina (GL) ela foi, em média, de 11 vezes. Quando da associação de ambas as suplementações com o estado sedentário esta se elevou para 16 vezes, ou seja, tivemos uma ampliação desta resposta, a qual não foi observada nos linfócitos obtidos do baço. No cenário de atividade física os dados ficam mais interessantes, onde há uma elevação de 7 vezes na proliferação linfocitária. A associação com óleo de peixe (EXN3) elevou a proliferação em 20 vezes, o que foi marcante. Já a suplementação com glutamina não promoveu efeito proliferativo diferente daquele já observado para o grupo EX. Interessantemente, a associação do exercício com as duas suplementações, elevou a proliferação para 24 vezes, o que foi excepcional. A explicação para tal achado, sugerimos ser pela ação dos ácidos graxos contidos no óleo de peixe propiciar a expansão clonal dos linfócitos deste órgão linfóide. Como óleo de peixe modifica fluidez de membrana, ele poderia estar possibilitando então maior divisão celular, entretanto não sabemos qual o mecanismo de ação pelo qual isto poderia ocorrer. Finalmente, nos linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico, a presença de óleo de peixe propiciou o dobro de proliferação (N3 e EXN3) em relação aos dois outros grupos sedentários. O mesmo foi observado no cenário de atividade física.

Todos estes dados em conjunto a respeito do sistema imunitário adquirido sugere que os linfócitos do timo, onde há a geração e maturação dos linfócitos, tem a maior proliferação celular e que os do baço e linfonodo menor proliferação, comparativamente. Baseado nisto, colocamos como crítica construtiva a conclusão de alguns trabalhos que utilizam linfócitos obtidos de única fonte e transportam os resultados obtidos nestes linfócitos como cenário da funcionalidade total do sistema imunitário. Isto não é verdade, pois demonstramos que no estado basal houve comportamentos distintos e quando da estimulação houve magnitude de estimulação também diferente. Quanto a nossa pergunta de associação de óleo de peixe, glutamina e exercício, somente nos linfócitos obtidos do timo é que houve resposta marcante.

5.0 - CONCLUSÕES

A glicemia dos animais após 48 horas estava normal, indicando que já tinham retornado ao estado de repouso.

A lactatemia dos animais exercitados foi de encontro à encontrada na literatura, indicando que nossos animais se exercitaram ao redor de 70% do VO_2 max.

A fagocitose de macrófagos peritoneais estava elevada em todos os grupos quando comparada à dos sedentários sem suplementação e em neutrófilos não se modificou.

O volume lisossomal dos macrófagos peritoneais também foi maior em todos os grupos, exceto o controle e nos neutrófilos este não se modificou.

Produção de ânion superóxido no macrófago não se alterou, mas no neutrófilo estava elevado no grupo suplementado com óleo de peixe ou glutamina e em todos os grupos submetidos a exercício físico.

A presença de óleo de peixe elevou a produção de peróxido de hidrogênio, bem como quando da prática de exercício físico. Nos neutrófilos tanto as suplementações quanto o exercício incrementaram a produção de peróxido de hidrogênio.

Os linfócitos obtidos do baço de animais exercitados apresentaram proliferação basal superior à dos animais sedentários. A proliferação estimulada por concanavalina-A foi maior nos linfócitos obtidos do timo em particular quando houve a combinação de glutamina e óleo de peixe no estado sedentário e foi quase o dobro quando associado à atividade física.

Por fim nossos dados sugerem que, as diferentes suplementações associadas a atividade física elevaram a resposta imunitária inata e adaptativa. Isoladamente a suplementação de óleo de peixe elevou a produção de H_2O_2 e O_2^- . Suplementação com glutamina não promoveu efeito. Associação de ambas suplementações ao exercício teve efeito aditivo principalmente no sistema adaptativo, especificamente sobre a proliferação de linfócitos obtidos do timo.

6.0 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Cel. Mol. Immun.** Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997.
- ABEYWARDENA, M. Y., HEAD, R. J. Longchain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function. **Cardiovasc.** 52:3, 361-372.
- ADAMS, D.O.; HAMILTON, T.A. The cell biology of macrophage activation. **Ann. Rev. Immunol.**, 2: 283-318, 1984.
- ALEXANDER, J.W. Immunonutrition: The role of n-3 fatty acids. **Nutrition.** 14: 627-633, 1988.
- ASHERIO, A. Dietary fat and risk of coronary heart disease in men: cohort follow-up study in the United States. **Br. Med.**, 313:84-90, 1996.
- BAETJER, A.M. The effect of muscular fatigue upon resistance. **Physiol. Rev.** 12: 453-468, 1932.
- BARBIOR, B.M. The respiratory burst of phagocytes. **J. Clin. Invest.**, 73: 599-601, 1984.
- BASSIT, R.A.; SAWADA L.A.; BACURAU, R.F.P.; NAVARRO F.; COSTA ROSA, L.F.B.P. The effect of BCAA supplementation upon the immune response of triathletes. **Med. Sci. Sports Exerc.**, 32(7): 1214-1219, 2000.
- BITTNER, S.B.; TUCKER, W.F.G.; CARTWRIGHT, I.; BLEEHEN, S.S. A double-blind, randomised, placebo-controlled trial of fish oil in psoriasis. **Lancet**, 378-380, 1988.
- BONATTO, S. J. R.; FOLADOR, A.; AIKAWA, J.; et al. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cellular Immunology**, San Diego-USA, 2004.
- BRAGA, L., MELLO, M., MANCHADO, F., GOBATO, C. Exercício contínuo e intermitente: efeitos do treinamento e destreinamento sobre o peso corporal e o metabolismo muscular de ratos obesos. *Ver. Port. Cien. Desp.*, 6(2) 160–169, 2002
- BROZNA, J.P.; HAUFF, N.F.; PHILLIPS, W.A.; JOHNSTON Jr., R.B. Activation of the respiratory burst in macrophages. **J. Immunol.**, 141: 1642-1647, 1988.

- BUCCI, L. Nutrients as Ergogenics aids for Sports and Exercise. **CRC Press**, Houston, 1^a, 1993.
- CALDER, P.C., YAQOOD, P., THIES, F., WALLACE, F.A., MILES, E.A. Fatty acids and lymphocytes functions. **British Journal of Nutrition**, 87, S31-S48, 2002.
- CALDER, P.C. Dietary fatty acids and the immune system. **Nutr. Rev.** 56: S70-S83, 1998a.
- CALDER, P.C. Dietary fatty acids and lymphocyte functions. **Proc. Nutr. Soc.** 57: 487-502, 1998b.
- CALDER P. C. N-3 Polyunsaturated fatty acids and Cytokine Production in Health and Disease. **Ann Nutr Metab.** 41:203-234, 1997.
- CASTELL, L.M. Glutamine supplementation in vitro and in vivo, in exercise and in immunodepression. **Sports Med.**, 33(5): 323-345, 2003.
- CASTELL, L.M. Can glutamine modify the apparent immunodepression observed after prolonged, exhaustive exercise? **Nutrition.** 18: 371-375, 2002.
- CASTELL, L.M.; NEWSHOLME E.A. The effects of oral glutamine supplementation on athletes after prolonged, exhaustive exercise. **Nutrition.** 13: 738-742, 1997a.
- CASTELL, L.M.; POORTMANS, J.R.; LECLERCQ, R.; BRASSEUR, M.; DUCHATEAU, J.; NEWSHOLME, E.A. Some aspects of the acute phase response after a marathon race, and the effects of glutamine supplementation. **Eur. J. Appl. Physiol.**, 75: 47-53, 1997b.
- CASTELL, L.M.; POORTMANS J.R.; NEWSHOLME E.A. Does glutamine have a role in reducing infections in athletes? **Eur. J. App. Phys.** 73: 488-490, 1996.
- COSTA ROSA, L., F., P., B., JUNIOR, M., L., B. Efeito do treinamento físico como Modulador positivo nas alterações no eixo neuroimunoendócrino em indivíduos com insuficiência cardíaca crônica: possível atuação do fator de necrose tumoral- α . **Soc. Bra. Med. Spo.** 11- 4, 2005.
- COSTA ROSA, L. F.P. B.; VAISBERG, M. W. Influências do exercício na resposta imune. *Rev. Bras. Med. Esporte*, 8, 167-172, 2002.
- COOPER, C. E.; VOLLAARD, N.,B.,J.; CHOUERI, T.; WILSON, M.,T.; Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.** 30:280-285, 2002.

CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, A.; PROCÓPIO, J. Entendendo a gordura: os ácidos graxos. **Manole**, São Paulo, 2002.

CURI, R.; NEWSHOLME, P.; NEWSHOLME, E.A. Intracellular distribution of some enzymes of the glutamine utilization pathway in rat lymphocytes. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 138: 318-322, 1986.

CRESWELL, P. Intracellular class II HLA antigens are accessible to transferrin-neuraminidase conjugates internalized by receptor-mediated endocytosis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 82(23): 8188–8192, 1985.

DAS, U.N. Beneficial effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids in the management of systemic lupus erythematosus and its relationship to the cytokine network. **Prostagl, Leukot and Essential Fatty Acids**, 51:207-213, 1994.

DROGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiol. Rev.** 82: 47–95, 2002.

DAVIS, J., M., MURPHY, E., A., BROWN, A., S., CARMICHAEL, M., D., GHAFAR, A., MAYER, E., P., Effects of beta-glucagon on innate immune function and susceptibility to respiratory infection. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 286:366-372, 2004.

EAGLE, H.; OYAMA, V.I.; LEVY, M. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. **J. Biol. Chem.**, 218: 607-617, 1955.

ENDRES, S.; GHORBANI, R.; KELLEY, V.E. The effects of dietary enrichment with **n-3** polyunsaturated fatty acids on the síntesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. **New Engl. J. Med.** 320: 265-71, 1989.

FEBRAIO, M., A. Exercise and inflammation. **J. App. Physiol.** 103:376-377, 2007.

FETT, C., A. et al. Suplementação de Ácidos Graxos Ômega-3 ou Triglicerídios de Cadeia Média para Indivíduos em Treinamento de Força. **Motriz**, v. 7, n. 2, 83-91, 2001.

FURTH, R. VAN; DIESELHOFF-DEN DULK, M.M.C.; MATTIE, H. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. **J. Exp. Med.**, 138: 1314-1330, 1973.

GIBALA, M.J. Regulation of skeletal muscle amino acid metabolism during exercise. **Int. J. Spo Nutr. Exerc. Metab.**, 11: 87-108, 2001.

GLADEEN, L., B. Lactate metabolism: a new paradigm for the third millenium. *J. Physiol.* 5-30, 2004.

GLEESON, M. Immune function in sport and exercise. *J. App. Physiol.* 103: 693–699, 2007.

GOBATTO, C., A.; MELLO, M., A., R.; SIBUYA, C, Y.; AZEVEDO, J. R., M.; SANTOS, L., S.; KOKUBUN, E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp. Biochem. Phy.** 130, 21-27, 2001.

GRIFFITHIS, RICHARD, D. The evidence for glutamine use in the critically-ill. **Proceed. Nut. Soc.**, 60 – 403 - 410, 2001.

GRUNDY, S. M. Dietary Fat. **Present Knowledge in Nutrition**, E. Ziegler & L. J. Filer, Washington , 7^a , 44- 57, 1996.

HARBIGE, L.S. Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and autoimmune disease. **Proc Nutr Soc.**, 57(4):555-562, 1998.

HE, K.; RIMM, E. B.; MERCHANT, A.; ROSNER, B. A.; STAMPER, M. J.; WILLETT, W. C.; ASCHERIO, A. Fish consumption and risk of stroke in men. **JAMA**, 288; 3130-3136, 2002.

HLASIWETZ, H.; HABERMANN, J. Ueber die proteinstoffe. **Ann. Chem.**, 169: 150-166, 1873.

JOYNER, M. Glutamine and arginine: Immunonutrients and metabolic modulators? **Exerc. Spo. Scien. Rew.**, 104-105, 2005.

KARLSSON, J. Exercise, **Mixed Diets and Nutrathrapy**. Champaign: Human Kinetics. 1997.

KREBS, H. The synthesis of glutamine from glutamic acid and ammonia, and the enzymic hydrolysis of glutamine in animal tissues. **Biochem. J.**, 33: 1951-1969, 1935.

KREIDER, R.B. Dietary supplements and the promotion of muscle growth with resistance exercise. **Sports Med.**, 27: 97-110, 1999.

KREMMER, J.M.; LAWRENCE, D.A.; JUBIZ, W.; DI GIACOMO, R.; RYNES, K.; BARTHOLOMEY, L.E.; SHERMAN, M. Dietary fish oil and olive oil supplementation in patients with rheumatoid arthritis. **Arthr. Rheumatism.**, 33:810-820, 1990.

KROMAN, N.; GREEN, A. Epidemiological studies in the Upernavik District, Greenland. *Acta Medica Scandinavica*, 208:401-406, 1980.

LACEY, J.M.; WILMORE, D.W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? **Nutr. Rev.**, 48: 297-309, 1990.

LAGRANHA, C., J., ALBA-LOUREIRO, T., C., MARTINS, E., F., PITHON-CURI, T., C., CURI, R. Neutrophil fatty acid composition: effect of a single session of exercise and glutamine supplementation. *Amino Acids*, 2007.

LARRABEE, R.C. Leucocytosis after violent exercise. **J. Med. Res.** 7: 76-82, 1902.

LEHNINGER, M., M. **Principles of Biochemistry**. Nelson, D. L. & Cox, New York: Worth Publishers, 3^a, 2000.

MANCHADO, F., GOBATTO, C., CONTARTEZE, R., V., L, PAPOTI, M., MELLO, M., A., R. Maximal lactate steady state in running rats, *J. Exerc. Physiol.* On line, 8-4, 2005.

MATHEWS, C., E, OCKENE, I.,S., FREEDSON, P., S., ROSAL, M., C., MERRIAM, P.,A., HERBERT, J.,R. Moderate to vigorous physical activity and the risk of upper-respiratory tract infection. **Med. Sc. Sports Exerc.** 34:1242-1248, 2002.

MEISTER, A. Catalytic mechanism of glutamine synthetase: overview of glutamine metabolism. In: *Glutamine: Metab. Enzymol. Regul.*, edited by Mora J. and Palacios R., New York: Academic, 1-40, 1980.

METCALF, D. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies *in vitro*. **J.Cell Physiol.**, 77: 277-280, 1971.

MEYDANI, S.N.; LICHTENSTEIN, A.H.; CORNWALL, S. Immunologic effects of cholesterol education panel step-2 diets with and without fish-derived n-3 fatty acid enrichment. **J. Clin. Invest.** 92:105-13, 1993.

MIYAZAKI, T.; SUZUKI, G.; YAMAMURA, K. The role of macrophages in antigen presentation and T cell tolerance. **Int. Immunol.**, 5: 1023-1033, 1993.

MOROZOV, V., I., TSYPLENKOV, P., A., GOLBERG, N., D., KALINSKY, M., I. The effects of high-intensity exercise on skeletal muscle neutrophil myeloperoxidase in untrained and trained rats. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 97: 716–722, 2006.

NAGATOMI R. The implication of alterations in leukocyte subset counts on immune function. **Exerc. Immunol. Rev.** 12:54-71, 2006

NETTLETON, J. A. Omega-3 fatty acids and health. **Chapman & Hall**. New York, 1995.

NEWSHOLME, P.; LIMA, M.M.R.; PROCÓPIO, J.; PITHON-CURI, T.C.; DOI, S.Q.; BAZOTTE, R.B.; CURI, R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. **Bra. J. Med. Bio. Res.** 36: 153-163, 2003.

NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.C. The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and speculative consequences for the whole animal. **Nutrition.** 13: 728-730, 1997a.

NIELSEN, H., B., PEDERSEN, B., K. Lymphocyte proliferation in response to exercise. **Eur. J. App. Phy.** 75: 375 – 379, 1997.

NIEMAN, D., C., DUMKE, C., I., HENSON, D., A., MACANULTY, S., R., LIND., R., H., MORROW, J., D. Immune AND oxidative changes during and following the western states endurance run. *Int. J.Spo. Med.* 24: 541-547, 2003.

NIEMAN, D., C. Risk of Upper Respiratory Tract Infection in Athletes: An Epidemiologic and Immunologic Perspective. *J. Athletic Train.* 32, 344- 349, 1997.

NIEMAN, D.; JOHANSEN, L.M.; LEE, J.W. ARABATZIS, K. Infectious episodes before and after the Los Angeles marathon. **J. Spo. Med. Phys. Fit.** 30: 289, 1990.

NOVAK, F., HEYLAND, D. K., et. al. Glutamine supplementation in serious illness: A systematic review of the evidence. **Crit. Care Med.**, V. 30, N. 9, 2002.

PABLO, M.A.; PUERTOLLANO, M.A.; CIENFUEGOS, G.A. Immune cell functions, lipids and host natural resistance. **FEMS Immun. Med. Microb.**, 29: 323-328, 2000.

PEDERSEN, B. K.; WOODS, J. A.; NIEMAN, D. C. Exercise-induced immune changes – a influence on metabolism? **Immunology trends**, 22:9, 473-474, 2001.

PEDERSEN, B. K., TOFT, A. D. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. **Br. J. Sports Med** 34:246–251, 2000.

PETERS, E.M.; GOETZCHE, J.M.; BROBBELAAR, B.; HOAKES, T.D. Vitamin C supplementation reduces the incidence of postrace symptoms of upper respiratory infection in ultramarathon runners. **Am. J. Clin. Nutr.**, 57: 170-174, 1993.

PITHON-CURI, T.C.; LEVADA, A.C.; LOPES, L.R.; DOI, S.Q.; CURI, R. Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47, p22 and gp91 in rat neutrophils. **Clin. Sci.** 103: 403-408, 2002.

QIN, S.; COBBOLD, S.; BEMJAMIN, R.; WALDMANN, H. Induction of classical tolerance in the adult. **J. Exp. Med.**, 169: 779-794, 1989.

QUINTANA, F., J., COHEN, I., R. Heat Shock Proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. **J. of Immunology**, 175:2777-2782, 2005.

ROGERO, M.M.; TIRAPEGUI, J. Aspectos nutricionais sobre glutamina e atividade física. **Nutrire: Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Braz. Soc. Food Nutr.**, São Paulo. 25, 87-112, 2003.

ROHDE, T.; MACLEAN, D.A.; PEDERSEN, B.K. Effect of glutamine supplementation on changes in the immune system induced by repeated exercise. **Med. Sci. Sport. Exerc.**, 30: 856-862, 1998.

ROITT, M.R. **Imunologia**. 5^a ed. brasileira, São Paulo: Atheneu, 1998.

ROMBALDI, A. J. (1996) Some biochemistry effects of liquid carbohydrate ingested on intermittent highintensity exercise performance in rats. Tese doutorado, **UFRS**, 1996.

ROSE, W.C. The nutritive significance of the amino acids. **Physiol. Rev.**, 18: 109-136, 1938.

SANTOS, R. V. T.; CAPERUTO, E. C.; COSTA ROSA, L. F. B. P. Effects of acute exhaustive physical exercise upon glutamine metabolism of lymphocytes from trained rats. **Life Sciences**, 80, 573–578, 2007.

SCHULZE, E.; BOSSHARD, E. Ueber das glutamine. **Landwirtsch Vers. Sta.**, 29: 295-307, 1883.

SILVA, A., S., R., SANTHIAGO., V., GOBATTO., C., A. Compreendendo o *overtraining* no desporto: da definição ao tratamento. *Rev. Port. Cien. Desp.*, 229–238, 2006.

SIMOPOULOS, A., P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. **Biomed. & Pharmacother.** 60, 502–507, 2006.

SIMOPOULOS A. P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomed. Pharmacother.** 56, 365-379, 2002.

SIMPSON, R. J., GERAINT D. FLORIDA-JAMES, G. D., COSGROVE, C., WHYTE, G., P., MACRAE, S., PIRCHER, H., GUY, K. High-intensity exercise elicits the mobilization of senescent T lymphocytes into the peripheral blood compartment in human subjects. **J. Appl. Physiol.** 103: 396–401, 2007

SMITH, D. J., NORRIS, S, R. Changes in glutamine and glutamate concentrations for tracking training tolerance. **Med.Sci. Spo. Exerc.**, 32, 684–689, 2000.

SPITTLER, A., et. al..Influence of glutamine on the function of monocytes. **Amer. Soc. Hemat.** 1564–1569, 1995.

SUGIURA, H., SUGIURA, H., NISHIDA, H., INABA, R., MIRBOD, S., M., IWATA, H. Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice, **J. Appl. Physiol.** 90: 789–794, 2001.

TOGNI, V.; OTTA, C.C.C.; FOLADOR, A. Câncer cachexia and tumor growth reduction in Walker 256 tumor-bearing rats supplemented with n-3 polyunsaturated fatty acids for one generation. **Nutrit. Cancer**, 46:52-58, 2003.

WHITACRE, C.M.; CATHCART, M.K. Oxygen free radical generation and regulation of proliferative activity of human mononuclear cells responding to different mitogens. **Cell Immunol.**, 144: 287-295, 1992.

WILLETT, W. C.; STAMPFER, M. J. Rebuilding the food pyramid. **Scientific American**, 288:52-59, 2003.

WOLACH, B., FALK, B., GAVRIELI, R., KODESH, E., ELIAKIM, A. Neutrophil function response to aerobic and anaerobic exercise in female judoka and untrained subjects. *Br J Sports Med*, **34**:23–28, 2000.

WU, D.; MEYDANI, S. N.; MEYDANI, M.; HAYEK M. G.; HUTH, P., NICOLOSI, R. J. **Immunologic effects of marine and plant derived n-3 polyunsaturated fatty acids in nonhuman primates.** *Am. J. Clin. Nutr.*, 63(2), 273-80, 1996.

ANEXOS

COMPOSIÇÃO RAÇÃO ANIMAL UTILIZADA NO EXPERIMENTO

Alimento completo para camundongos e ratos NUVILAB CR1

Alimento equilibrado para camundongos e ratos de laboratório, baseado em recomendações do National Research Council e National of Health – USA.

Composição básica do produto

Carbonato de cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcio, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral de aminoácidos, aditivo antioxidante.

Níveis de garantia:

Umidade (máx.) - 12,50 %
Proteína bruta (min.) - 22,00 %
Extrato etéreo (min.) - 4,00 %
Material mineral (Max.) - 10,00 %
Matéria fibrosa (Max.) - 8,00 %
Cálcio (máx.) - 1,40 %
Fósforo (min.) - 0,80 %

Suplementação por quilo não menos que:

Vitamina:

Vitamina A – 12.000 UI
Vitamina D3 – 1.800 UI
Vitamina E – 30,00 mg.
Vitamina K3 – 3,00 mg.
Vitamina B1 – 5,00 mg.
Vitamina B2 – 6,00 mg.
Niacina – 60,00 mg.
Ácido pantotênico – 20,00 mg.
Ácido fólico – 1,00 mg.
Biotina – 0,05 mg.
Colina – 600,00 mg.

Microelementos minerais:

Ferro - 50,00 mg.
Zinco – 60,00 mg.
Cobre – 10,00 mg.
Iodo – 2,00 mg.
Manganês – 60,00 mg.

Selênio – 0,05 mg.
Cobalto – 1,50 mg.

Aminoácidos:

DL-metionina – 300.000 mg
Lisina – 100,00 mg.

Aditivos:

Antioxidante – 100,00 mg.

Composição por macronutrientes

66% de carboidratos
23% de proteínas
4% de lipídios
6% de fibras
1% de vitaminas e minerais

Percentual (g.) por 100 g. de ração

Cálculo da porcentagem de calorias de macro nutrientes (porcentagem)

Carboidratos: $66 \times 4 \text{ kcal} = 264 \text{ kcal}$
Proteínas: $23 \times 4 \text{ kcal} = 92 \text{ kcal}$
Lipídios: $4 \times 9 \text{ kcal} = 36 \text{ kcal}$
Total calórico = 392 kcal

Nuvital – CNPJ 77.043.511/001-15
Inscrição estadual – 10301197-34
Estrada da ribeira, 3001 – km 3 – CEP: 83.408-000 – Colombo – PR.
(41) 2169-3100
www.nuvital.com.br

PARÂMETROS FISIOLÓGICOS DE RATOS

HARKNESS, J., E.; WAGNER, J., E. Biologia e clínica de coelhos e reodores, Ed. Roca, 3ª Ed., 1989.

Os valores relacionados abaixo são aproximações e não necessariamente representam os níveis normais de uma determinada população. As fontes consultadas estão incluídas entre os textos citados no capítulo 1 e as publicações específicas após as respectivas seções do capítulo 2 do livro acima mencionado.

Peso adulto (macho)	450 a 520 g.
Peso adulto (fêmea)	250 a 300 g.
Peso ao nascer	5 a 6 g.
Área de superfície corpórea	10,5 (peso em gramas) ^{2/3}
Temperatura corpórea	35,9 a 37,5° C
Número de cromossomos em célula diplóide	42
Ciclo de vida	2,5 a 3,5 anos
Consumo de alimento	10 g./100 g./ dia
Consumo de água	10 a 12 ml/ 100g/ dia
Trânsito gastrointestinal	12 a 14 h.
Início da vida reprodutiva (macho)	65 a 110 dias
Início da vida reprodutiva (fêmea)	65 a 110 dias
Duração do ciclo estral	4 a 5 dias
Tempo de gestação	21 a 23 dias
Dia pós-parto	Fértil
Tamanho da ninhada	6 a 12 filhotes
Idade do desmame	21 dias
Duração da vida útil reprodutiva	
Biotério	350 a 440 dias
Criações comerciais	7 a 10 ninhadas
Produtividade	4 a 5 filhotes/mês
Composição do leite	
Gorduras	13 %
Proteínas	9,7 %
Lactose	3,2 %
Frequência respiratória	70 a 115 mov. respiratórios./min.

Volume inspirado	0,6 a 2,0 ml.
Consumo de oxigênio	0,68 a 2,0 ml.
Frequência cardíaca	250 a 450 bpm.
Volume sanguíneo	54 a 70 ml/Kg.
Pressão sanguínea	84 a 134/60 mmHg.
Eritrócitos	7 a 10 X 10 ⁶ /mm ³
Hematócrito	30 a 48 %
Hemoglobina	11 a 18g./100 ml.
Leucócitos	6 a 17 X 10 ³ /mm ³
Neutrófilos	9 a 34 %
Linfócitos	65 a 85 %
Eosinófilos	0 a 6 %
Monócitos	0 a 5 %
Basófilos	0 a 1,5 %
Plaquetas	500 a 1.300 X 10 ³ /mm ³
Proteína sérica	5,6 a 7,6g./ 100ml.
Albumina	3,8 a 4,8 g./100 ml.
Globulinas	1,8 a 3,0 g./ 100 ml.
Glicose sérica	50 a 135 mg./100 ml.
Nitrogênio sanguíneo (uréia)	15 a 21 mg./ 100ml.
Creatinina	0,2 a 0,8 mg./ 100 ml.
Bilirrubina total	0,20 a 0,55 mg./ 100 ml.
Lípídeos séricos	70 a 415 mg./ 100 ml.
Fosfolípídeos	70 a 415 mg./ 100 ml.
Triacilglicerol	26 a 145 mg./ 100 ml.
Colesterol	40 a 130 mg. / 100 ml.
Cálcio sérico	5,3 a 13 mg. / 100 ml.
Fosfato sérico	5,3 a 6,3 mg. / 100 ml.

DEFINIÇÕES CONCEITUAIS

Efeito imuno-modulador - Células de nossa imunidade inata onde se caracterizam barreiras físicas, células fagocitárias no sangue e tecidos, uma classe de linfócitos denominados matadores naturais (*natural killers*-NK), e diversas moléculas originárias do sangue (ABBAS *et al.*, 1997. p.4).

Overtraining - Definido como um distúrbio neuroendócrino, que ocorre no eixo hipotálamo-hipófise, resultado do desequilíbrio entre a demanda do exercício e a capacidade de resposta do organismo (SILVA e GOBATTO, 2006).

DEFINIÇÕES OPERACIONAIS

Treinamento de alta intensidade em ratos (Exercício crônico) – Entendido como a sobrecarga de 6% do peso corporal em natação durante o período de uma hora e trinta minutos com 2 intervalos a cada 30 minutos (GOBATTO, 2001).